UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1966

Série U - N° 433

# THÈSE

présentée

## A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

**Jean-Pierre ROUSSELET**

Présentée et soutenue publiquement le : 15 juin 1966

## *Contribution à l'étude pharmacologique du transport des colloïdes d'or radioactif par le sang et les exsudats séreux*

Jury : MM. G. VALETTE Président
M. GUILLOT, Y. COHEN } Examinateurs

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1966

Série U - N° 433

# THÈSE

présentée

## A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

**Jean-Pierre ROUSSELET**

Présentée et soutenue publiquement le : 15 juin 1966

# *Contribution à l'étude pharmacologique du transport des colloïdes d'or radioactif par le sang et les exsudats séreux*

Jury : MM. G. VALETTE Président
M. GUILLOT, Y. COHEN } Examinateurs

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

## Administration

| | |
|---|---|
| MM. VALETTE G. | Doyen, O + |
| JANOT M.M. | Assesseur, O + |
| RAOULD Y. | Assesseur, + |
| RODINEAU L. | Secrétaire Général, + |
| Mme. FERRARI S. | Attachée Principale, |
| M. JEANDEL L. | Attaché, |
| Mme. ESPINASSE M.L. | Attachée, |
| Mme. PEILLON C. | Attachée, |
| MM. BRENN A. | Attaché, + |
| JACOB A. | Attaché, + |

## Doyen Honoraire

FABRE R. - Membre de l'Institut, C +

## Professeurs Honoraires

| | |
|---|---|
| MM. LAUNOY L. | O + , |
| FLEURY P. | O + , |
| PICON M. | O + , |
| MM. BEDEL C. | + , |
| FABRE R. | Membre de l'Institut, C + |

## Professeurs

| | |
|---|---|
| MM. JANOT M.M., O + | Parmacie Galénique (T) |
| VALETTE G., O + | Pharmacodynamie (T) |
| PARIS R., + | Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T) |
| GUILLOT M., O + | Physique (T) |
| GAUTIER J.A., O + | Chimie organique (T) |
| Mlle. LAMBIN S., + | Microbiologie (T) |
| MM. RAOUL Y., + | Physiologie (T) |
| COURTOIS J., + | Chimie biologique (T) |
| DOMANGE L., O + | Chimie Générale et Minérale (T) |
| TRUHAUT R., O + | Toxicologie et Hygiène Industrielle (T) |
| MORETTE A., + | Hydrologie |
| CAVIER R., + | Parasitologie (T) |
| QUEVAUVILLER A., + | Hygiène et Education Sanitaire (T) |
| MOREAU R., + | Pharmacie chimique (T) |
| GERMAN A., | Virologie et Sérologie (T) |
| PIETTE M., + | Biologie sanguine (T) |
| MM. MALANGEAU P., | Chimie analytique (T) |
| GIRARD M., + | Biochimie Appliquée (T) |
| DILLEMANN G., | Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T) |
| DEYSSON G., | Botanique (T) |
| FLAHAUT J., | Minéralogie (T) |
| RENAULT J., | Chimie organique (T) |
| LE HIR A., | Pharmacie galénique |
| BOUDENE C., | Toxicologie et Hygiène industrielle (T) |
| LARUELLE P., | Physique |
| ROSSIGNOL P., | Pharmacodynamie |
| MANGEOT A., | Pharmacie galénique industrielle |
| DELAVEAU P., | Matière médicale |
| COHEN Y., | Sciences naturelles (Pharmacodynamie) |
| RENAULT H., | Physique |
| BOURDON R., | Chimie analytique |
| REYNAUD P., | Pharmacie chimique |

## Maitres de Conférences

| | |
|---|---|
| MM. LE MOAN G., | Toxicologie |
| PAOLETTI C., | Toxicologie |
| POISSON J., | Pharmacie galénique |
| DESVIGNES A., | Cryptogamie et technique bactériologique |
| PERCHERON F., | Chimie biologique |
| SAVEL J., | Biologie animale |
| BORY M., | Microbiologie |
| MIOCQUE M., | Chimie organique |
| GUIGNARD J.L., | Botanique générale |
| GOUNELLE J.C., | Physiologie |
| MM. BINET P., | Biologie animale |
| COMBET-FARNOUX C., | Chimie organique |
| Mme. PLAT M., | Législation et Déontologie pharmaceuti |
| MM. DELACOUX E., | Pharmacie chimique |
| ADOLPHE C., | Physique |
| DIDRY J., | Mathématiques appliquées aux sciences expérimentales |
| GUERNET M., | Chimie analytique |
| KHODADAD P., | Chimie minérale |
| LEDOUBLE G., | Chimie minérale |

## Chefs de travaux pratiques

| | |
|---|---|
| MM. ASTIN C. (F.F.) | Physique |
| AYMARD P. (F.F.) | C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments, Section Biologie |
| Mme. BLANC J., | Mathématiques |
| Mlle. BOURNIQUE C. (F.E.) | Physiologie végétale |
| M. CARLIER A. (F.F.) | C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle |
| Mme. CENAC J. (F.F.) | C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique |
| Mme. CHARPENTIER M., | Chimie Préparation |
| M. CHARLES J. (F.F.) | Mathématiques |
| Mlle. CHOIX M., | Pharmacie Galénique |
| MM. DACRON C., | Chimie organique |
| COMPAGNON P. (F.F.) | Chimie organique |
| Mlle. DECAUDIN M.T., | Parasitologie |
| MM. DREUX C. | C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'analyse |
| DUMANT G. (F.F.) | Chimie Préparation |
| ETIENNE J. (F.F.) | Physique |
| Mlle. FLEURY S., | Chimie |
| Mlle. GESTEAU S., | C.E.S. de Biochimie |
| Mlle. COURSAT M.J. (F.F.) | Botanique |
| MM. GUERIN H. + | Essais des drogues végétales |
| HAMON M., | Chimie analytique |
| Mme. HARISPER M., | Chimie organique |
| MM. HARISPE J., + | Chimie organique |
| HAZEBROUCQ G., | Physique |
| HENRY J., | Chimie |
| Mme. HUBERT J., | C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique |
| Mme. HURON M.J. (F.F.) | Mathématiques |
| Mlle. JUND Y., | C.E.S. Immunologie |
| M. LAROCHE J., | Physique |
| Mme. LEGER N. (F.F.) | Zoologie |
| MM. LELUC R., | Microbiologie |
| LEMONNIER A., | Chimie analytique |
| Mlle. LONGEVIALLE M. (F.F.) | Botanique |
| Mlle. LONGUEVALLE S., | Chimie analyses |
| MM. MANDEREAU J. (F.F.) | C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique |
| MARTIN-FRERE H., | Chimie organique |
| Mlle. MORIN H. | C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments |
| M. MOSKOWITZ H., | Chimie organique |
| Mme. NOTTEGHEM M. (F.F.) | Zoologie |
| MM. NGUYEN PHU LICH (F.F.) | C.E.S. Toxicologie et études sanitaire |
| PERLES R., | C.E.S. Biochimie |
| PESTIS J. (F.F.) | Biologie animale |
| Mlle. PINGUET A. (F.F.) | C.E.S. Analyse appliquée au contrôle d médicaments, Section Physico-Chimie |
| MM. POULLAIN P., | C.E.S. Hématologie |
| POUSSET J.L. (F.F.) | C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique |
| Mme. PRAT M.T. (F.F.) | Mathématiques |
| MM. RAYNAUD G., | Anatomie et histologie |
| RIVET J., | Physique |
| Mlle. ROLLEN A., + | Botanique |
| Mme. ROBERT M., | C.E.S. Immunologie Générale et Appliq |
| SEILLER M. (F.F.) | Pharmacie Galénique Industrielle |
| MM. THUONG CONG TRIEU (F.E) | Chimie analytique |
| YONGER J., | Chimie analytique |

## Bibliothèque

| | |
|---|---|
| Mlle. RUYSSEN Y. + | Conservateur en Chef chargé de la direction |
| LAVAUD S. + | Conservateur |
| Mme. DESGRIPPES A., | Conservateur |
| Mlle. BOUVRESSE A.M., | Bibliothécaire |

## Lègende

+ Légion d'Honneur O Officier C Commandeur

Ce travail a été effectué dans le Groupe d'Etudes et de Contrôles Pharmaceutiques du Département des Radio-éléments du Commissariat à l'Energie Atomique.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Notre Maître Monsieur G. VALETTE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris, Professeur titulaire de la chaine de Pharmacodynamie de la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a bien voulu suivre nos recherches avec une constante bienveillance et accepté la présidence de cette thèse.

En témoignage de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

A Monsieur M. GUILLOT

Professeur titulaire de la Chaire de Physique de la Faculté de Pharmacie de Paris, qui nous a reçu avec beaucoup de sympathie et a accepté de faire partie de notre jury.

Qu'il agrée l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur Y. COHEN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui nous a fait l'honneur de nous proposer ce sujet de thèse, de diriger nos travaux et qui nous a prodigué ses conseils avec une grande indulgence.

En témoignage de toute notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Haut-Commissaire à l'Energie Atomique

dont la bienveillance nous a permis d'effectuer un stage au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay et de disposer de moyens matériels efficients.

A Monsieur C. FISHER

Chef du Département des Radioéléments, qui nous a accueilli dans ses laboratoires du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay et nous a accordé toutes facilités pour poursuivre nos recherches .

A nos Maîtres de l'Ecole Nationale
de Médecine et de Pharmacie
de Rouen,

avec l'expression de notre respectueuse gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546822_0022

A Monsieur J. WEPIERRE

Maître de Conférence Agrégé à l'Ecole de Pharmacie de Dijon, qui n'a jamais cessé de nous encourager et de nous aider au cours de notre travail.

Qu'il soit assuré de notre fidèle reconnaissance et de notre profonde amitié.

A Mademoiselle R.M. AH-KY
A Madame L. BAUTERS
A Monsieur J. BRUNEAU
A Monsieur R. CARRE
A Monsieur J.C. GALINIER
A Monsieur M. LEBON

Avec nos très vifs remerciements pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée.

A tout le personnel du Groupe d'Etudes et de Contrôles Pharmaceutiques du Département des Radioéléments.

A mes Parents,

A ma Famille,

A mes Amis,

# TABLE DES MATIÈRES


Pages

INTRODUCTION ..... 15

PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I - Physico-chimie des colloïdes ..... 19

CHAPITRE II - Système réticulo-endothélial ..... 29

CHAPITRE III - Propriétés biologiques des radiocolloïdes ..... 35

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV - Méthodes d'études et comportement des colloïdes d'or vis-à-vis de ces techniques ..... 45

CHAPITRE V - Répartition de l'or colloïdal dans le plasma et les éléments figurés du sang ..... 63

CHAPITRE VI - Etude de la liaison "*in vitro*" des particules colloïdales d'or 198 avec les protéines sériques de sujets sains ..... 67

CHAPITRE VII - Etude de la liaison "*in vivo*" des particules colloïdales d'or 198 avec les protéines sériques de sujets sains ..... 77

CHAPITRE VIII - Etude de la liaison de l'or ionique 198 aux protéines sériques ..... 83

CHAPITRE IX - Etude de la liaison "*in vitro*" des colloïdes d'or avec les protéines des liquides d'épanchement ..... 89

CHAPITRE X - Etude de la liaison "*in vivo*" des colloïdes d'or avec les protéines sériques et exsudatives du Rat porteur d'une inflammation expérimentale locale ..... 95

DISCUSSION GENERALE ..... 103

CONCLUSION GENERALE ..... 109

BIBLIOGRAPHIE ..... 111

# INTRODUCTION

Depuis que MULLER, en 1945, a ouvert une nouvelle voie de la radiothérapie par administration *in situ* des colloïdes radioactifs, de nombreux éléments ont été proposés : $^{65}Zn$, $^{90}Y$, $^{32}P$, $^{198}Au$, etc... Le plus utilisé à l'heure actuelle est l'or colloïdal $^{198}Au$ dont la production française s'est élevée en 1965 à 824 Curies. Cette substance est utilisée non seulement en thérapeutique anticancéreuse, mais encore dans les épreuves fonctionnelles de la circulation hépatique et du système réticulo-endothélial, ainsi que dans l'examen anatomique externe du foie (Scintigraphie hépatique).

La préparation du colloïde d'or, empirique à l'origine, a conditionné la taille des particules colloïdales ou le choix du colloïde protecteur, la gélatine.

Si dans l'ensemble, les résultats thérapeutiques comme les études biologiques ont été concordants, on relève, à une lecture attentive de la littérature, de fréquentes discordances suivant les auteurs.

Ces discordances semblent provenir du fait que le colloïde d'or radioactif n'a pas la même provenance. On connaît un colloïde dont la taille des particules s'étage de 3 mμ à 20 mμ, deux colloïdes homogènes, l'un de 30 mμ, l'autre de 5 mμ, et dont les phases dispersantes sont composées d'une solution aqueuse de gélatine accompagnée d'adjuvants divers.

Ces substances sont administrées par voie intersticielle, par voie sanguine ou dans les cavités naturelles distendues par des liquides d'épanchement pathologiques.

Suivant la voie d'administration, l'état du patient et l'origine du colloïde, le devenir de ce dernier dans l'organisme présente des particularités que nous avons cherché à analyser.

Nous nous sommes proposés dans ce travail d'étudier les modalités du transport du colloïde d'or dans le sang et dans les liquides pathologiques, de confirmer une éventuelle liaison avec les protéïnes de ces humeurs et d'identifier les fractions protéiques responsables de cette liaison en précisant la composition exacte des diverses préparations colloïdales d'or radioactif et en cherchant à relier les variations de leurs proprietes biologiques à leurs caractéristiques physicochimiques.

Dans ce but nous avons fait appel aux méthodes d'études propres à la radioactivité que nous avons combinées aux techniques de séparation des protéines. Nos recherches ont porté sur diverses espèces d'animaux de laboratoire (Lapin, Cobaye, Rat) et, en collaboration avec l'Institut Gustave Roussy à Villejuif, sur l'Homme.

Dans une première partie, nous rappelons les travaux antérieurs ayant porté sur la physicochimie des colloïdes, en général, et des radiocolloïdes d'or, plus particulièrement, sur la physiologie du système réticulo-endothélial dans ses rapports avec le transport sanguin des colloïdes, et enfin sur les propriétés biologiques des radiocolloïdes.

Dans une seconde partie, de travaux personnels, nous exposons les méthodes générales d'études que nous avons choisies : sédimentation - autoradiographie, fractionnement électrophorétique et mesure de la densité optique des électrophorégrammes et des documents autoradiographiques obtenus, filtration - exclusion sur gel de dextrane et détermination de la concentration protéique et de la radioactivité des fractions séparées.

Ces méthodes ont été appliquées à l'étude de la répartition de l'or entre le plasma et les éléments figurés du sang, de la liaison *in vitro* des particules colloïdales avec des protéines du sérum de sujets sains, du même phénomène *in vivo* sur plusieurs espèces d'animaux de laboratoire.

Nous avons complété nos recherches en opérant sur des liquides d'épanchement pathologiques humains et sur des rats porteurs d'inflammation expérimentale locale.

Dans une discussion générale, nous faisons la part des résultats qui confirment les travaux antérieurs et nous cherchons à établir les relations qui semblent exister entre les propriétés physicochimiques et le comportement biologique des trois préparations colloïdes d'or expérimentées.

Notre conclusion dégage les constatations à portée générale qui découlent de ce travail dont l'orientation pharmacologique dans le domaine de la radioactivité n'est pas à souligner.

# PREMIÈRE PARTIE

# TRAVAUX ANTÉRIEURS

Après avoir énoncé les propriétés physicochimiques essentielles des colloïdes, nous étudierons le devenir biologique de ces substances et, en relation avec leur transport par le sang, leur captation par les éléments du Système Réticulo-Endothélial (S.R.E) que nous définirons, tant du point de vue anatomique que du point de vue physiologique.

Nous résumerons les connaissances acquises jusqu'alors sur le rôle des protéines sériques, dans le transport des substances et particulièrement dans le transport de l'or colloïdal radioactif.

CHAPITRE PREMIER

# PHYSICO-CHIMIE DES COLLOIDES

La chimie des colloïdes, plus que centenaire, puisqu'elle est née en 1861 avec un mémoire de GRAHAM, n'a pas cessé de susciter de nombreuses recherches. Ce sujet si vaste et complexe paraît avoir été divisé en autant de problèmes qu'il y avait de groupes scientifiques ou industriels travaillant sur les colloïdes, plus attentifs à leurs propres difficultés qu'aux problèmes généraux. En outre les mêmes problèmes étaient abordés d'un côté par des physiciens et de l'autre par des chimistes et transformés de telle sorte que l'on avait peine à reconnaître leur origine commune.

Si certains aspects de cette science déjà ancienne ont été parfaitement élucidés, d'autres, loin d'être résolus, font l'objet de travaux modernes en partie suscités par l'apparition des radiocolloïdes qui conservent, à ce que certains appellent la "colloïdologie", un caractère d'actualité.

Nous nous contenterons ici de donner une définition et une classification des colloïdes fondées sur leurs principales propriétés physico-chimiques. Nous envisagerons ensuite les radio-colloïdes qui tiennent une place à part parmi ces substances du fait des obligations posées par leurs emplois thérapeutiques.

## I - DEFINITION

Le terme de "colloïde" a d'abord été attribué par Thomas GRAHAM en 1861 à des corps non cristallisables comme les colles ou les gommes qui ont, en solution, la propriété de diffuser très lentement. En opposition le mot "cristalloïde" caractérise des molécules susceptibles de cristalliser tels que les sucres ou les sels. En se basant sur ces faits expérimentaux incontestables GRAHAM a différencié les solutions vraies, données par les cristalloïdes, des solutions colloïdales.

Cette opposition "cristalloïde - colloïde" n'est plus acceptable puisque depuis cette époque bien des colloïdes authentiques ont été cristallisés et qu'une structure cristalline a été reconnue chez beaucoup d'autres. Il y a lieu alors de considérer d'autres caractères physico-chimiques sur lesquels ont insisté de nombreux auteurs parmi lesquels nous citerons ALEXANDER (1937), KRUYT (1949), McBAIN (1950), AUDUBERT (1956) et QUELET (1961).

Il nous semble que les solutions colloïdales doivent être, comme le considère DUCLAUX (1953) et JIRGENSON (1962), surtout définies par l'état de division des particules qu'elles contiennent plutôt que par toute autre propriété. Le colloïde est alors envisagé sous l'angle de système dispersé.

D'une manière générale on désigne sous le nom de systèmes dispersés des systèmes constitués par une phase liquide, solide ou gazeuse au sein de laquelle une deuxième phase solide, liquide ou gazeuse se trouve disséminée à l'état de particules plus ou moins fines. Ainsi une substance solide, dite phase dispersée, peut être divisée dans un liquide, dit phase dispersante, selon différents degrés de finesse (OSTWALD - 1909).

Cette définition embrasse un ensemble considérable allant des précipités visibles à l'oeil nu jusqu'aux confins des solutions moléculaires en passant par les suspensions et les colloïdes. La dimension moyenne des granules caractérise le degré de la dispersion. Une substance aura un grand degré de dispersion si elle est très finement divisée et un faible degré si elle l'est de façon plus grossière. Selon le degré de dispersion les propriétés du système dispersé changent ainsi que l'indique le tableau I.

La solution colloïdale est ici caractérisée par des particules qui mesurent en général de 100 mμ à 10 mμ de diamètre incapable de dialyser et dont la vitesse de sédimentation est très

lente. Il y a cependant un passage continu entre les solutions vraies, les solutions colloïdales et les suspensions.

En général le mode de préparation ou les moyens de séparation font qu'un échantillon renferme des particules de grosseurs diverses comprises dans un certain intervalle de tailles. Ainsi un colloïde sera dit "polydispersé" si les particules ont des tailles très diverses ou "monodispersé" si ces dernières ont des dimensions voisines.

Tableau I

Place des colloïdes dans le système dispersé solide- liquide
(KRUYT et OVERBEEK, 1961)

| | Suspension | Colloïde | Solution vraie |
|---|---|---|---|
| Taille moyenne des particules | 1μ - 500 mμ | 100 mμ - 10 mμ | 1 mμ - 0,1 mμ |
| Propriétés | filtrable sédimentation rapide | non dialysable sédimentation très lente | dialysable pas de sédimentation |

A ces deux types de dispersion peuvent de plus correspondre soit un colloïde lyophobe, soit un colloïde lyophile. Dans le premier, la phase dispersée est composée de petites molécules, insolubles dans le liquide, qui restent à l'état de particules polymoléculaires ; cette non miscibilité de la particule et du milieu extérieur caractérise le colloïde lyophobe. Dans le deuxième, la phase dispersée est au contraire constituée de grosses molécules (albumine, gélatine), qui à la différence des précédentes, sont solubles dans le solvant et se dispersent à l'état moléculaire mais leur masse et leur taille sont telles que le degré de dispersion correspond à celui d'une solution colloïdale. Cette affinité de la particule pour le liquide dispersant caractérise le colloïde lyophile. Si l'on ne considère que l'eau comme solvant, on appellera le premier groupe de colloïdes, hydrophobe et le seconde, hydrophile.

## II - PROPRIETES DES SOLUTIONS COLLOIDALES

Les solutions colloïdales ont une pression osmotique très faible. Leur tension de vapeur, leur point d'ébullition et leur point de congélation sont très peu différents de ceux du liquide dispersant. Ces propriétés rendent compte du poids moléculaire élevé des particules qui forment la phase dispersée.

En dehors de ces propriétés qui permettent de différencier un colloïde d'une solution vraie, les solutions colloïdales, ou sols, ont des propriétés particulières telles que leur stabilité et leur floculation. Ainsi sous l'influence de divers facteurs un colloïde peut s'avérer stable ou instable. Cette instabilité se traduira par une floculation qui n'est autre qu'une séparation de la phase dispersée en gros flocons, par une coagulation qui est une prise en masse de l'ensemble, ou enfin par une sédimentation des particules.

### A - Stabilité des colloïdes

Les particules colloïdales sont animées de mouvements désordonnés, appelés les mouvements browniens, qui traduisent l'agitation thermique des molécules de la phase dispersante. La rapidité et l'amplitude de ces mouvements sont d'autant plus faibles que la taille des particules est plus élevée et que la viscosité du milieu est plus grande (DUCLAUX - 1938).

Les mouvements browniens ont une influence sur la stabilité des colloïdes qui diffère selon la nature lyophobe ou lyophile du sol. Nous étudierons donc successivement la stabilité de ces deux types de colloïdes en insistant sur les premiers.

#### a) Colloïdes lyophobes

Au premier abord on peut se demander pourquoi un colloïde lyophobe constitué par des agrégats polymoléculaires sans affinité pour le solvant peut être stable. En effet, les particules arrivent en contact l'une de l'autre sous l'influence des mouvements browniens et la tension superfi-

cielle, existant à la limite des phases dispersante et dispersée, devrait développer une énergie suffisante pour agglomérer les particules en éléments plus gros, de surface moindre, qui auraient tendance à sédimenter.

Ce phénomène, en réalité, ne se produit pas car les particules sont stabilisées par des charges électriques (VERWEY et OVERBEEK, 1948), dont l'origine est variable.

D'une part elles peuvent provenir de groupements ionisables constitutifs de la particule. D'autre part ces charges électriques peuvent tirer leur origine d'une adsorption d'ions présents dans la phase dispersante.

La présence des particules chargées produit une redistribution des ions de la solution. Les ions de signe opposé à celui de la particule tendent à s'accumuler autour de cette dernière pour satisfaire à l'électro-neutralité de la solution. Il existe alors autour de la particule une "double couche électrique" constituée d'une part des "ions de paroi" et d'autre part des ions de signe opposé appelés "ions complémentaires". Mais l'agitation thermique tend à détruire la disposition ordonnée précédente, si bien que la couche externe est constituée d'une atmosphère ionique diffuse (GOUY, 1895) où la densité de charge décroît de manière exponentielle à partir de la surface de la particule.

La courbe de la figure 1 représente la différence de potentiel $\pi$ entre la surface de la particule et la solution dispersante en fonction de l'éloignement (SOUCHAY, 1961).

- Entre a et b il existe un potentiel constant qui caractérise la particule.

- Entre b et c il se produit une décroissance du potentiel. La paroi étant chargée, il convient de considérer une première variation $\varepsilon$ assez brusque du potentiel (potentiel de contact) puis au delà de la distance d, intervient la couche à répartition diffuse dont la densité fonction de la distance, est subordonnée à la valeur et à la concentration des ions (STERN, 1924) et qui représente le potentiel électrocinétique.

- A partir de c on retrouve le niveau de potentiel qui caractérise le liquide de dispersion.

Les charges électriques communiquent donc aux particules lyophobes des propriétés analogues, dans une certaine mesure, à celles des ions. C'est ainsi que les particules chargées du colloïde se déplacent dans un champ électrique. Par cette méthode, HARDY (1900) a montré que la charge de certaines particules pouvait être changée par des modifications de pH et annulée à la neutralité. Or à ce point isoélectrique le colloïde est instable. Cette expérience prouve que la stabilité d'un colloïde lyophobe est reliée à sa charge électrique qui s'oppose à l'agrégation des particules par des forces de répulsion électrostatique.

L'existence des systèmes colloïdaux lyophobes dépend donc de deux facteurs contraires : une force de tension superficielle qui tend à rassembler les particules et une force de répulsion électrique qui tend à les écarter l'une de l'autre (HAMAKER, 1936). Dans une solution colloïdale la force de répulsion est normalement prépondérante ; elle décroît en effet comme le carré de la distance (loi de COULOMB) alors que la force d'attraction due aux forces de VAN DER WAALS décroît selon la septième puissance de la distance (KRUYT - OVERBEEK, 1961).

La couche externe des charges électriques maintient normalement les particules à une distance suffisante pour que les forces d'attraction restent négligeables. Mais, sous l'influence de certains facteurs, l'équilibre de ces forces peut être renversé ; par exemple, si l'addition d'électrolytes au colloïde ne modifie pas les forces d'attraction, par contre la distribution des charges électriques est fortement perturbée ce qui peut entrainer, ainsi que nous le verrons ultérieurement, la destruction du colloïde.

b) Colloïdes lyophiles

Dans ce groupe les colloïdes hydrophiles, qui sont des éléments constitutifs de la matière vivante, ont une grande importance biologique.

La phase dispersée est ici constituée par des macro-molécules qui, comme les particules des colloïdes lyophobes, possèdent des charges électriques apportées le plus souvent par des groupements ionisables du type - COOH, - $SO_3H$, - $PO_3H$, - $NH_2$, etc... Ces macromolécules peuvent renfermer de nombreux radicaux dissociables, on les appelle des "polyélectrolytes". Elles se déplacent dans un champ électrique, leurs solutions conduisant le courant électrique. Comme pour les colloïdes lyophobes, les charges électriques participent à la stabilité de la dispersion. Cependant un autre facteur favorable intervient car les molécules sont solubles dans le solvant. Elles ont tendance à se répartir à l'état monomoléculaire dans la phase dispersante et même à contracter avec celle-ci

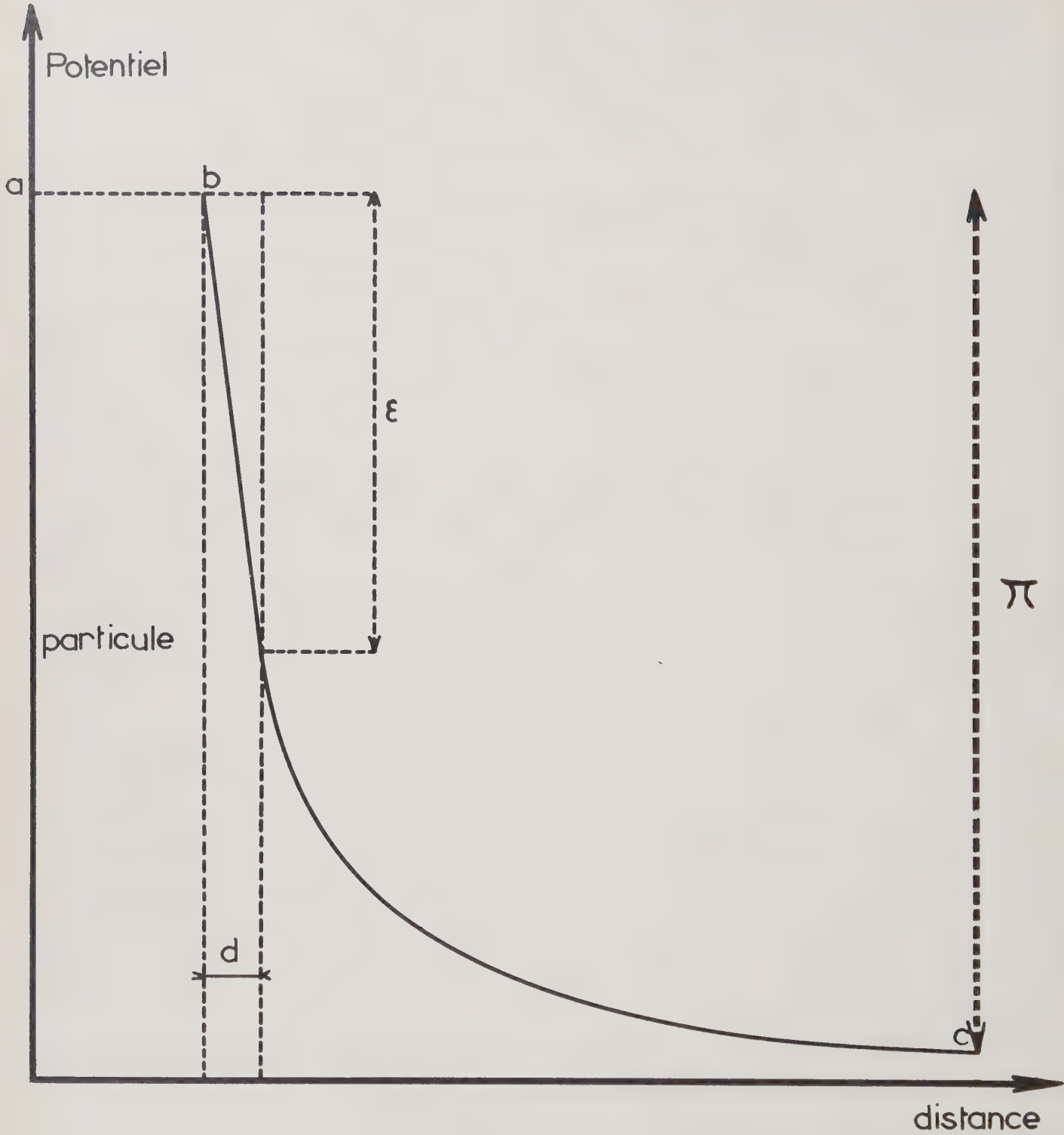



Figure 1 - Potentiel à la surface d'une particule en fonction de la distance (SOUCHAY - 1961).

des liaisons qui tendent à maintenir les molécules séparées les unes des autres. L'affinité du solvant pour la molécule dispersée est d'ailleurs maximum lorsqu'il y a une analogie de constitution ou de polarité entre les groupements de cette dernière et ceux du solvant.

L'interaction entre la phase dispersée et la phase dispersante, appelée solvation ou encore hydratation si le solvant est l'eau, confère à la solution colloïdale lyophile une meilleure stabilité que ne le font les seules charges électriques pour les colloïdes lyophobes. La grande stabilité des colloïdes lyophiles est surtout assurée par l'interaction des particules avec le solvant. Cette propriété peut aussi être transmise aux colloïdes lyophobes en les additionnant de certains colloïdes hydrophiles appelés "colloïdes protecteurs" (ZSIGMONDY, 1901).

c) Colloïdes protégés

L'addition d'un colloïde protecteur à un colloide lyophobe permet de conférer à ce dernier les caractéristiques d'un colloïde lyophile et en particulier une grande stabilité. Les molécules du protecteur sont adsorbés à la surface des particules lyophobes qui sont en quelque sorte isolées du solvant. Le colloïde ainsi obtenu possède les propriétés de l'enveloppe qui l'entoure et se trouve "protégé". Dans le cas le plus simple il se forme une enveloppe de solvatation ou d'hydratation à la surface des particules lyophobes par adsorption de molécules orientées. Par exemple la gélatine enrobe d'une couche de molécules orientées les particules d'or d'une solution d'or colloïdal.

La réalité de ces enveloppes de solvatation, soupçonnées par SPRING (1900) puis décrites théoriquement par QUINCKE (1902) et OSTWALD (1909), a reçu une confirmation expérimentale par l'observation au microscope électronique de particules d'or protégées (THIESSEN, 1942).

L'enveloppe d'adsorption qui confère à la particule ses propriétés lyophiles peut aussi participer à la stabilité par protection stérique et électrostatique.

1/ *Protection stérique*

Il y a "protection stérique" (MYERS, 1956) quand l'épaisseur et la résistance mécanique de l'enveloppe protectrice sont suffisantes pour empêcher par encombrement que la force attractive de tension interfaciale ne prenne une valeur suffisante pour entraîner l'agrégation des particules au moment de leurs collisions provoquées par le mouvement brownien. L'enveloppe protectrice maintient ainsi les particules écartées les unes des autres.

Ces caractéristiques de l'enveloppe protectrice sont contradictoires avec le fait que celle-ci doit posséder des propriétés lyophiles c'est-à-dire avoir tendance à se disperser sous forme monomoléculaire dans le solvant. L'épaisseur de l'enveloppe devrait donc avoir tendance à diminuer.

Compte tenu de cette contradiction JACKEL (1964) a défini les propriétés fondamentales qu'une substance protectrice devait posséder pour assurer une protection stérique.

1/ Les molécules du colloïde protecteur doivent être capables de former autour de la particule une couche solvatée suffisamment épaisse.

2/ La structure des molécules solvatées du colloïde protecteur doit être mécaniquement assez solide pour que l'enveloppe protectrice ne soit pas comprimée irréversiblement même par de fortes collisions avec d'autres particules.

3/ Les molécules du colloïde protecteur doivent adhérer solidement à la surface de la particule pour que l'enveloppe protectrice ne se détache pas de son support.

2/ *Protection électrostatique*

En plus de la protection stérique le colloïde lyophile apporte par ses groupements ionisés une protection électrostatique. Il se forme au delà de l'enveloppe protectrice une double couche électrique, qui, ainsi que nous l'avons vu pour les colloïdes lyophobes, participe à la stabilité du sol.

En résumé un colloïde protecteur apporte à la particule lyophobe les facteurs de stabilité qui caractérisent un colloïde lyophile :

1/ Une double douche électrique,

2/ Des particules solvatées,

et de plus l'encombrement stérique de l'enveloppe protectrice participe aussi à cette stabilité de dispersion.

B - Floculation des colloïdes

Un colloïde peut devenir instable et par suite floculer sous l'influence de divers facteurs tels que vieillissement, variation de température, agitation mécanique, addition d'électrolytes ou de substances non électrolytiques.

Comme pour la stabilité, nous retrouvons ici une grande différence entre les colloïdes lyophobes peu stables et les colloïdes lyophiles ou protégés qui sont remarquablement résistants aux agents de dénaturation.

Divers auteurs ont étudié les effets du vieillissement, de l'agitation mécanique et des variations de température sur les solutions colloïdales mais l'action des électrolytes sur les colloïdes à phase dispersée aqueuse semble la plus intéressante dans notre cas particulier. Nous nous limiterons donc à celle-ci en ce qui concerne les deux types de colloïdes hydrophobes et hydrophiles.

a) Colloïdes hydrophobes

La stabilité de ces colloïdes est due à leurs charges électriques disposées selon une double couche. Toute cause susceptible de les diminuer (en valeur absolue) provoque une diminution de stabilité et même la floculation. C'est ainsi que des électrolytes modifiant les propriétés électriques de la double couche ou encore la charge de la particule, sans agir sur les forces attractives de VAN DER WAALS, peuvent dénaturer le colloïde (FREUNDLICH, 1910). En effet si l'on considère une suspension colloïdale dans l'eau et qu'on y ajoute un électrolyte, les ions étrangers peuvent influencer le potentiel électrocinétique, défini à propos de la stabilité des colloïdes lyophobes, de deux façons :

- soit en agissant sur l'épaisseur de la couche diffuse de STERN : c'est l'effet de force ionique qui contracte l'atmosphère ionique autour de la particule (KRUYT et OVERBEEK, 1961),

- soit en agissant sur la distance définie par le potentiel de contact. Cet effet, le plus important, est généralement la conséquence du précédent : les ions de signe contraire à la charge de la particule sont maintenant suffisamment près de celle-ci pour y être attirés ; accédant ainsi à la surface de la particule, ils s'y adsorbent et neutralisent électriquement sa charge (SOUCHAY, 1961).

Les particules peuvent alors se rapprocher davantage les unes des autres ce qui permet aux forces de tension superficielle de prendre une valeur suffisante qui entraîne l'agrégation des particules et leur floculation ultérieure.

Les ions n'agissent pas seulement par leur charge mais également par leur valence. C'est ainsi que les ions polyvalents ont une action floculante plus importante que ne l'ont les ions monovalents. Ces constatations expérimentales ont été généralisées sous le terme de loi de SCHULZE et HARDY qui s'énonce de la manière suivante :

1/ L'action floculante d'un sel vis-à-vis d'un colloïde électrolytique est déterminée par l'ion de signe contraire à celui de la particule colloidale;

2/ L'ion est d'autant plus actif que sa valence est plus élevée.

D'après les théories électrocinétiques les ions polyvalents seraient beaucoup plus attirés par la particule et l'atmosphère ionique en serait d'autant plus amincie.

b) Colloïdes hydrophiles et colloïdes protégés

Les électrolytes modifient la double couche électrique de ces colloïdes à faible dose, mais n'ont pas d'action floculante car les particules ont un facteur de stabilité beaucoup plus important : la solubilité des macromolécules dans le liquide de dispersion, laquelle assure une interaction solvatation - hydratation entre les deux phases.

Néanmoins en grande quantité les électrolytes peuvent précipiter de tels colloïdes par un phénomène de relargage en deux étapes : l'addition des premiers milliéquivalents modifie la double couche électrique et supprime la stabilité par charges électrostatiques ; les suivants entrent en compétition avec les particules pour le liquide de dispersion (salting out) ; ils captent les molécules solvatantes d'hydratation ce qui supprime le deuxième facteur de stabilité du colloïde et provoque sa précipitation.

Toutefois la précipitation peut présenter plusieurs stades intermédiaires dont l'un est la coacervation, caractérisée par la formation d'agglomérats de particules plus ou moins hydratées, ou coacervats. La liquide de dispersion est appauvri en particules et la précipitation se produit lorsque les agglomérats sont complètement deshydratés.

La dénaturation des colloïdes hydrophiles est réversible à condition de ne pas avoir altéré la nature des molécules de la phase dispersée. La solution colloïdale peut être régénérée, on dit encore peptisée, en ajoutant par exemple de l'eau ou en éliminant les électrolytes.

## III - CLASSIFICATION DES COLLOIDES

Nous avons jusqu'à présent admis qu'il existait deux grandes classes de colloïdes, les colloïdes lyophobes et les colloïdes lyophiles, différant par l'affinité des particules de la phase dispersée pour le milieu dispersant.

Pourtant il est nécessaire d'admettre avec STAUDINGER (1950) que cette classification est loin de donner entière satisfaction et qu'elle doit être complétée par la considération d'autres facteurs. En effet la forme linéaire, plane ou globuleuse, la structure moléculaire ou micellaire, la charge négative ou positive sont des aspects non négligeables de la particule colloïdale.

Par contre, d'autres différences ne semblent plus devoir être retenues. Les termes d'émulsoïdes et de suspensoïdes n'ont plus qu'une signification historique ainsi d'ailleurs que les expressions de colloïdes minéraux et colloïdes organiques. Les qualités de "réversibilité et d'irréversibilité" ou encore de "résolubilité et d'irrésolubilité" font ressortir clairement que certains colloïdes après précipitation ou dessication peuvent être peptisés alors que d'autres sont dénaturés de manière définitive. Ces qualificatifs, qui décrivent le comportement extérieur des colloïdes rendent compte de leur capacité de solvatation ou d'hydratation et correspondent à la distinction entre colloïdes lyophobes et colloïdes lyophiles.

Ces différents critères vont nous servir à la description des préparations des radiocolloïdes en général et des colloïdes d'or en particulier.

## IV - LES RADIOCOLLOIDES

Depuis l'apparition des radioéléments certains sont mis sous forme colloïdale et utilisés en tant que "radiomédicaments" (COHEN, 1962). Le but bien précis assigné à ces préparations oblige les thérapeutes et les cliniciens à restreindre la définition que nous avons adoptée pour les colloïdes.

### A - Définition

Parmi les radioéléments à usage médical, nombreux sont ceux qui correspondent à la définition d'un colloïde ; on peut citer l'or colloïdal, le complexe colloïdal de phosphore 32, l'Albumine Humaine marquée au brome 82 ou à l'iode 125 ou 131, le fibrinogène marqué à l'iode 125 ou 131.

Sont retenues en thérapeutique des préparations qui ne sont en réalité que des suspensions (phosphate de chrome $^{32}P$) et sont éliminés d'authentiques sols tels que l'albumine iodée et le fibrinogène $^{131}I$.

En effet, au cours des traitements par les radiocolloïdes il est nécessaire de disposer de particules insolubles dans les liquides de l'organisme dont la taille peut être parfois plus élevée que celle correspondant à un colloïde. Cela a conduit CHEVALIER (1963) à proposer que seuls les suspensoïdes strictement insolubles (on devrait plutôt dire "seuls les colloïdes hydrophobes"), non hydrolysables, résistant aux enzymes tissulaires soient considérés comme des colloïdes radioactifs propres à l'usage thérapeutique. MARIGNAN (1963) s'appuie aussi sur ce caractère d'insolubilité des particules radioactives pour distinguer les radiocolloïdes des colloïdes macromoléculaires solubles.

### B - Propriétés

Si l'on admet le caractère de permanence de l'insolubilité de la particule radioactive, le radiocolloïde possède alors les propriétés d'un colloïde lyophobe c'est-à-dire peu de stabilité à moins d'être protégé. En plus, il possède une certaine radioactivité qui permet de le détecter facilement. Pour cela il est nécessaire de bien préciser les caractères de la radioactivité (nature et énergie du rayonnement, période) et les caractéristiques des grains colloïdaux (taille, forme, charge électrique) (BELLION, 1964), ce que nous allons faire à propos des solutions colloïdales d'or 198 utilisées au cours de ce travail et qui comprennent :

- l'or colloidal Au-198-S-2 (Saclay - France)
- l'or colloïdal petites particules Au-198-S-6 (Saclay - France)
- l'or colloïdal polydispersé Au-198-GCS 1P (Amersham - Grande Bretagne)

C - Préparation et caractéristiques des colloïdes d'or utilisés

L'or naturel est l'isotope 197 ; soumis à un bombardement de neutrons thermiques il peut se transformer en or 198 radioactif par capture d'un neutron. L'isotope 198 peut lui-même capturer une particule pour donner l'or 199 selon la réaction :

$$^{197}_{79}Au \xrightarrow{n.\gamma.} {}^{198}_{79}Au \xrightarrow{n.\gamma.} {}^{199}_{79}Au$$
$$\downarrow \beta^-.\gamma \qquad \downarrow \beta^-.\gamma.$$
$$^{198}_{80}Hg \qquad ^{199}_{80}Hg$$

les deux isotopes auriques instables se désintégrant avec émissions de particules $\beta^-$ et rayonnement $\gamma$ en $^{198}Hg$ et $^{199}Hg$, corps stables.

Pratiquement l'or est irradié dans le réacteur EL.3 par un flux de neutrons de $2.10^{13}$ n/cm²/s .

Le schéma de désintégration de l'or 198 (fig. 2) indique le processus d'émission des divers rayonnements ; la période de désintégration étant de 2,7 jours.

1/ Prépration des colloïdes d'or

La préparation des sols d'or se fait en deux étapes à partir de feuilles d'or irradiées ; la première, appelée nucléation, consiste à favoriser la formation de grains colloïdaux de 4 à 5 mμ (germes) dans une solution de chloraurate de Na, mis en présence d'agents de stabilisation ; la deuxième, dénommée croissance, a pour but de laisser grossir les particules formées dans la première phase (TURKEVICH, STEVENSON et coll., 1951).

La phase de nucléation qui nécessite un potentiel redox plus élevé est au C.E.A. séparée de la suivante par l'utilisation successive de deux réducteurs différents. La nucléation est obtenue par réduction au glucose ; elle aboutit à la formation de particules petites et régulières de 5 mμ. Cette solution est le soluté colloïdal d'or radioactif à petites particules S6.

La croissance est réalisée grâce aux propriétés réductrices de la gélatine (groupes aminés, guanidines). Une solution gélatineuse de chloraurate de sodium est ensemencée par le germe dont les particules, qui deviennent des centres de cristallisation, atteignent des diamètres de 30 mμ (HENRY, HERCZEG et coll., 1957). On complète la réduction à l'aide d'une solution d'ascorbate de sodium (CONSTANT, MAISIN et coll., 1960). Le colloïde ainsi préparé constitue le soluté colloïdal d'or radioactif S2.

2/ Caractéristiques et compositions des colloïdes d'or

Celles-ci sont définies soit par la Pharmacopée Française (1965) et le Cahier de spécifications des radioéléments à usage médical du C.E.A. en France (Saclay) soit par le catalogue du Centre Radiochimique d'Amersham en Grande-Bretagne.

1/ *Soluté injectable d'or colloïdal radioactif* (Pharmacopée Française, 1965) Référence C.E.A. : Au - 198 - S - 2

La préparation officinale est constituée de particules de taille comprise entre 20 et 40 mμ dispersées dans une solution aqueuse de gélatine et de glucose rendue isotonique par le chlorure de sodium dont la composition centésimale est indiquée par le Tableau II.

Ce colloïde se présente sous forme d'un liquide rouge rubis foncé, de pH compris entre 5 et 6, stérile et apyrogène, de concentration radioactive déterminée.

2/ *Soluté d'or colloïdal radioactif petites particules non codex* - Référence C.E.A. : Au - 198 - S - 6

Les particules sont plus petites que dans la préparation précédente ; leur taille est comprise entre 3 et 5 mμ. La composition présente quelques différences (forte teneur en glucose, absence d'acide ascorbique) (Tableau II).

Ce soluté est un colloïde rouge rubis foncé de pH 5 à 7, stérile et apyrogène, de concentration radioactive déterminée (DOUIS, 1963).

3/ *Soluté d'or colloïdal radioactif polydispersé* (non inscrit à la Pharmacopée Britannique) Réf. Radiochemical Centre : GCS. 1P Gold 198

La préparation est constituée par des particules de dimension moyenne de 10 à 12,5 mμ (les dimensions extrêmes sont de 5 et 22 mμ) dispersées dans une solution de gélatine à 3,5 % additionnée de 28 % de glucose (Tableau II).

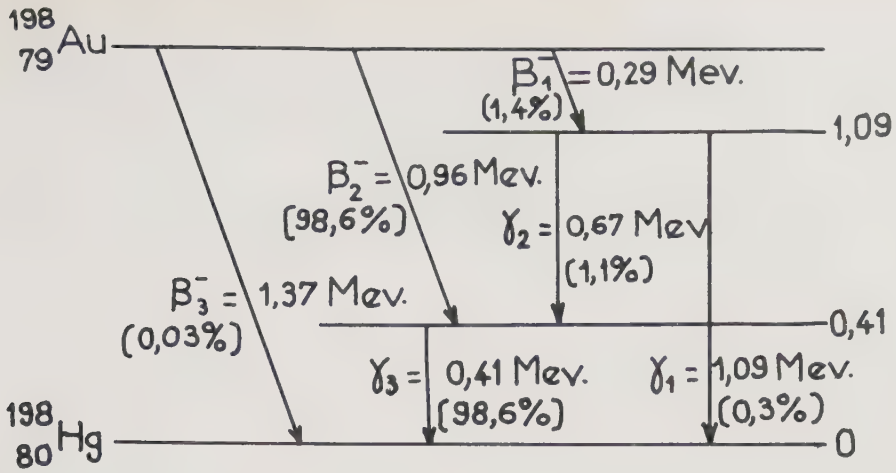



Figure 2 - Schéma de désintégration de l'or 198.

Tableau II

Composition des différents colloïdes d'or utilisés
(exprimés en mg/ml)

| | Colloïdes d'Or 198 | | |
|---|---|---|---|
| | S-2 (30 mμ) | S-6 (5 mμ) | GCS 1P (polydispersé) |
| Teneur en Or | 3,5 | 3,5 | 10 |
| Glucose | 2 | 200 | 280 |
| Acide ascorbique | 7 | | |
| Na Cl | 5 | 5 | 7 |
| Gélatine officinale | 30 | 30 | 35 |
| Eau distillée | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| pH | 5 - 7 | 5 - 7 | 4 - 6 |
| Or soluble | 2 % | 2 % | 0,01 % |

C - Essais des colloïdes d'or 198

L'emploi des solutions colloidales en médecine nécessite qu'elles soient soumises à des contrôles rigoureux (COHEN, 1959).

1/ *Contrôle physique*

Ce contrôle consiste à déterminer la concentration radioactive, la pureté radioactive et la taille des particules.

a) La concentration radioactive est appréciée par mesure à la chambre d'ionisation ou par tout autre procédé à condition d'opérer par rapport à un étalon. La précision obtenue est de l'ordre de 5 %.

b) La pureté radioactive (encore appelée pureté radio-isotopique ou pureté radionuclidique) est déterminée par spectrométrie du rayonnement $\gamma$ qui permet d'isoler les pics d'énergie et de mettre en évidence diverses impuretés radioactives telles que l'or 199. Les diverses préparations décrites contiennent moins de 1 % d'impuretés radioactives.

c) La mesure de la taille des particules par microscopie électronique montre que les dimensions des grains des préparations françaises sont très homogènes : respectivement 4 mμ ± 1 et 30 mμ ± 10, alors que l'or colloïdal préparé par Amersham est polydispersé c'est-à-dire que la taille des grains est comprise entre 5 et 22,5 mμ. Ces résultats ont pu être retrouvés par d'autres techniques telles que la centrifugation (GIRARDI et PIETRA, 1961) ou l'analyse de phénomènes optiques (DOREMUS, 1964) (CARO, INGRAND, 1965).

2/ *Contrôle radiochimique*

La recherche de l'or 198 ionique diffusible est nécessaire car son comportement dans l'organisme est différent de celui de l'or 198 particulaire. La séparation des deux formes d'or est obtenue par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 pendant 1 heure 30 dans le solvant acétone : 70 ml, eau : 20 ml, HCl (d : 1,19) : 10 ml. Dans ces conditions le Rf du colloïde est égal à zéro, celui de l'or soluble est égal à un. L'enregistrement de la radioactivité le long du chromatogramme permet de calculer la proportion d'or soluble de chacune des préparations. Les solutions que nous avons utilisées contenaient toutes moins de 2 % d'or soluble pour l'or français et moins de 0,01 % pour l'or anglais.

3/ *Contrôle biologique*

Les colloïdes d'or destinés à usage médical subissent des contrôles de stérilité et d'apyrogénéité.

Les caractéristiques physico-chimiques des colloïdes d'or 198 sont dès lors bien définies. Ainsi l'on pourra savoir si elles conditionnent le comportement des grains colloïdaux dans l'organisme.

Dans l'organisme, le système réticulo-endothélial réagit à l'égard des colloïdes ; c'est pourquoi nous allons en rappeler les particularités anatomiques et physiologiques.

## CHAPITRE II

# SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL

Pour mieux comprendre le devenir d'un radiocolloïde dans l'organisme, il nous est nécessaire de rappeler les particularités anatomiques et les propriétés physiologiques du système histiocytaire, encore appelé Système Réticulo-Endothélial.

Le système réticulo-endothélial (S. R. E.) dont le nom a été proposé par ASCHOFF (appareil métabolique réticulo-endothélial), ne peut être défini qu'en fonction de ses propriétés physiologiques. Il régit certains processus d'équilibre humoral et biochimique des organismes et possède certaines propriétés de défense. Son caractère le plus particulier est sa faculté fixatrice (fonction pexique) à l'égard des corps étrangers introduits dans l'organisme ou de métabolites qu'un dérèglement fonctionnel accumule. Ces propriétés physiologiques communes à certains éléments anatomiquement disparates dans l'organisme vont nous permettre de les réunir en un groupe cohérent.

## I - RAPPEL ANATOMIQUE

Depuis les travaux d'ASCHOFF (1924) les tissus et organes contenant des histiocytes, cellules originaires du mésenchyme dont elles conservent les potentialités évolutives, sont considérés comme faisant partie du système réticulo-endothélial parce que le tissu réticulé et certains endothéliums en sont des éléments.

Les histiocytes sont rencontrés dans les tissus réticulé, conjonctif, endothélial et dans la microglie.

Le tissu réticulé, qui a pour cellules des histiocytes fixes et pour substance fondamentale la réticuline, constitue la trame des organes hématopoïétiques (ganglions lymphatiques, rate, moelle osseuse), forme le tissu de soutien des lobules du foie et se trouve souvent mêlé au tissu conjonctif notamment au niveau des zones de contact entre ce dernier et les épithéliums.

Le tissu conjonctif est formé comme le précédent de deux éléments : des cellules de provenance histiocytaire, dénommées fibroblastes ou fibrocytes, et une substance fondamentale le collagène.

Enfin, dans le tissu endothélial on rencontre des histiocytes qui bordent les "sinusoïdes" (capillaires sanguins et lymphatiques) des organes où existe le tissu réticulé et qui se distinguent des autres cellules endothéliales par un cytoplasme plus abondant. Ces cellules sont nombreuses dans la rate, la moelle osseuse, le foie où elles prennent le nom de cellules de Küpffer et dans les poumons. Pour FRANCHESCHINI (1954) l'équivalent pulmonaire de la cellule de Küpffer est la cellule adventitielle péricapillaire très nette chez l'Homme alors qu'elle n'existe pas chez le Rat. COLLET et POLICARD (1962) ont prouvé à l'aide de carbone colloïdal que c'est l'endothélium qui est l'agent pexique principal du poumon conformément d'ailleurs aux conceptions classiques (BARGMANN, 1956).

Cependant tous ces éléments histiocytaires, réputés fixes, ont la propriété d'être mobilisés sous l'influence de facteurs biochimiques divers mal connus tels que l'inflammation.

Les histiocytes mobiles sont des éléments figurés normaux du sang (monocytes et lymphocytes) mais aussi des cellules migratrices abondantes dans le conjonctif sous épidermique et au voisinage des séreuses (Tableau III).

Les divers éléments du S. R. E. sont donc très polymorphes et dispersés dans l'organisme, bien que le foie en renferme la majeure partie, ce qui rend impossible toute définition de ce système basée sur des notions anatomiques.

De plus, la forme et la structure des cellules peuvent se modifier sous l'influence de substances chimiques secrétées par des agents agressifs ou des tissus enflammés. Dans certains cas on peut même assister à la transformation réversible d'un lymphocyte en macrophage ou encore de certaines cellules musculaires en cellules histiocytaires (CHEVREMONT, 1939 - 1945).

Ce polymorphisme explique les nombreux noms proposés pour désigner les éléments du S.R.E. : macrophage (METCHNIKOFF, 1895) histiocyte (ASCHOFF, 1924), polyblaste (MAXIMOV, 1924), clasmocyte (RANVIER, 1900), etc... Il semble néanmoins que l'on désigne actuellement sous le nom de macrophages les histiocytes en état d'activité (DELABARRE, 1952).

Tableau III

Eléments du S. R. E. d'après HOUSSAY (1950) et BAILLIF (1960)

Histiocytes

| Histiocytes fixes (macrophages) | | | | Histiocytes mobiles (macrophages) | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tissu réticulé | T. conjonctif | T. endothélial | microglie | sang | tissus |
| des gang. lymphatiques | | sinusoïdes de rate | | | |
| de la rate | | masse osseuse | | monocytes lymphocytes | histiocytes migrateurs |
| de la moelle osseuse | | foie (Küpffer) | | | |
| foie | | poumons | | | |

II - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DU S. R. E.

On se heurte encore à de nombreuses difficultés pour définir le S. R. E. d'après ses propriétés physiologiques.

Le S. R. E. intervient dans le métabolisme du fer, des lipides (cholestérol), des protides ; il possède une fonction cytopoïétique puisqu'il préside à l'hématopoièse et à la fabrication de nombreuses cellules tissulaires (histiocytes, fibroblastes) ; enfin il est doté de la propriété antixénique qui concerne l'élaboration des anticorps et les phénomènes de phagocytose.

Cependant l'aptitude évolutive des histiocytes, leur fonction phagocytaire et notamment leur propriété d'exercer l'ultraphagocytose à l'égard des particules très tenues semblent être les critères les plus sûrs pour caractériser le S. R. E.

Nous nous attacherons donc à l'étude de ce dernier phénomène.

A - La phagocytose

La phagocytose est la propriété commune à de nombreux êtres unicellulaires d'englober, d'incorporer et de détruire diverses particules organiques : germes, virus, débris cellulaires.

Mise en évidence dans les organismes supérieurs la fonction phagocytaire a été reconnue par la suite aux cellules du S. R. E. qui peuvent en outre absorber des éléments plus volumineux tels que des erythrocytes, des cellules, mais aussi de fines particules colloïdales, auquel cas on parle de colloïdopexie.

B - La colloïdopexie

1/ Définition

La colloïdopexie est la fonction par laquelle les éléments du S. R. E. fixent, englobent et phagocytent les particules colloïdales fines ou macromoléculaires introduites dans l'organisme.

2/ Mise en évidence

La mise en évidence de la fonction colloïdopexique des cellules réticulo-endothéliales de l'organisme a d'abord été réalisée à l'aide de colorants tels que le Rouge Congo (ADLER et REIMANN,

1929) et le Bleu Trypan ou encore de solides dispersés à l'état de très petites particules comme le Thorotrast (dioxyde de thorium) (IRWIN, 1932 - WEN et JUNG, 1933) ou l'encre de chine (HALPERN, BIOZZI, MENE, 1950 - STIFFEL, 1958).

Aujourd'hui l'utilisation des radiocolloïdes constitue une nouvelle étape dans les moyens d'investigations du S. R. E. et spécialement de mise en évidence de ses éléments. En effet, les colloïdes ordinaires ne peuvent être détectés qu'à l'échelle histologique ou être dosés dans le sang donnant ainsi la fraction de colloïde non fixé ; par contre les colloïdes radioactifs permettent une exploration dynamique de la capacité de fixation du S. R. E. lui même, en dehors de tout prélèvement, par simple détection externe.

Dans ce but on emploie couramment les solutions colloïdales d'or 198 stables, dont les grains peu diffusibles et de diamètre déterminé ont la même affinité que les colloïdes non radioactifs pour les macrophages du S. R. E. (CONSTANT, MAISIN et coll., 1960).

3/ Caractère de la colloïdopexie

Il est généralement admis que la granulopéxie ou colloïdopexie est un phénomène irréversible (HALPERN - BENACERRAF et coll., 1957). Il semble pourtant qu'elle puisse être transitoirement réversible. En effet, GOSSELIN (1956) a étudié *in vitro* la fixation de l'or colloïdal $^{198}Au$ par les macrophages isolés de la cavité péritonéale de Lapin. Il a montré que la colloïdopexie comportait deux phases : d'abord une adsorption réversible des particules d'or sur la paroi cellulaire puis un passage irréversible à l'intérieur de la cellule.

Ce phénomène de réversibilité a été retrouvé *in vivo* chez le Lapin par SICOT, AFIFI et coll. (1963). Ces auteurs, après administration intraveineuse d'or colloïdal 198, ont pu provoquer une augmentation de la radioactivité plasmatique par une deuxième injection d'or colloïdal non radioactif. Ce phénomène, attribué à une libération dans le sang des particules d'or fixées sur les cellules réticulo-endothéliales, a été appelé "phénomène de chasse" ; il est transitoire et d'autant plus net que la deuxième injection est plus proche de la première. On peut supposer comme dans le cas précédent, que la captation des particules se fait en deux phases et que le phénomène de chasse est observable tant que les particules colloïdales sont simplement adsorbées à la surface des phagocytes.

4/ Facteurs modifiant la fonction pexique

La colloïdopexie s'exerce normalement dans l'organisme à l'égard des quelques particules colloïdales qui peuvent s'y trouver accidentellement. De même après injection de très faibles quantités de solutions colloïdales on constate la captation immédiate des particules ainsi que l'ont montré de nombreuses expériences. Par contre lorsque la quantité de colloïde est importante la disparition du colloïde circulant est lente à se produire car l'absorption nécessite la mise en activité du S. R. E. qui se traduit par une mobilisation des histiocytes.

On pourra de ce fait modifier la colloïdopéxie en stimulant ou déprimant l'activité du S. R. E. Les deux principaux facteurs qui peuvent changer l'activité pexique étant, comme l'a dit HALPERN, l'état physicochimique des particules et l'état physiologique du sujet d'expérience.

a) *Facteurs de stimulation de l'activité pexique*

- *Propriétés physico-chimiques des particules*

L'activité granulopéxique du système histiocytaire a été mesurée chez différents animaux à l'aide de diverses substances : saccharate d'oxyde de fer chez le Rat (BENACERAFF, STIFFEL et coll., 1954), particules minérales de carbone (BIOZZI, BENACERAFF et coll., 1953), solutions colloïdales d'or 198 (BENHAMOU, 1957 - MEREDITH, 1961 - BILLITERI, GASSO et coll., 1962) chez le Lapin, complexe albuminique iodé (HALPERN, BIOZZI, et coll., 1958) chez la Souris, le Rat, le Cobaye et le Lapin. Ces auteurs ont constaté que les lois régissant l'activité phagocytaire du S. R. E. étaient retrouvées chez les différentes espèces animales avec des substratums de nature physico-chimique différente et de taille variant entre 0,0025 $\mu$ (saccharate d'oxyde de fer) et 10 $\mu$ (globules rouges de Pigeon).

- *Etat physiologique du sujet*

L'un des plus sûrs moyens d'activer le S. R. E. est de provoquer une inflammation locale qui entraîne un ralentissement de la circulation, une acidose et de l'anoxie qui sont trois facteurs susceptibles de mobiliser et de provoquer l'afflux des macrophages. Pour arriver à ce but on peut

utiliser les agents inflammatoires (Kaolin, carragénine, formol) utilisés pour déterminer l'activité anti-inflammatoire des médicaments (MARCY, 1961).

Des agents beaucoup moins phlogogènes sont aussi capables de mobiliser les cellules du S. R. E. en agissant par d'autres mécanismes (formations d'anticorps). C'est le cas de divers extraits microbiens tels que le W X B 3148 (BIOZZI, HALPERN et coll., 1962), le B. C. G. (BIOZZI, BENACERRAF et coll., 1954), l'adjuvant de FREUND (NEWBOULD, 1963 BUCHI, CHIARLE et coll., 1965), les lipopolysaccharides extraits des bactéries Gram négatif (BIOZZI, BENACERRAF et coll., 1955). Même des facteurs lipidiques obtenus soit à partir de saccharomyces cerevisiae (levures de bière), soit à partir de foie de requins, se sont révélés être d'excellents stimulants du S. R. E. (appelés "restims" par les anglo-saxons) chez la Souris (HELLER, RANSOM et coll., 1962).

Certaines substances stéroïdiques ou apparentées, injectées dans le torrent circulatoire sont capables de modifier l'activité colloïdopexique sans posséder d'activité inflammatoire notable. En effet, NICOL (1932) a souligné l'effet stimulant des oestrogènes puis des substances à propriétés oestrogéniques sur le S. R. E. en mettant en évidence une augmentation de l'activité pexique des macrophages. Ces travaux ont été confirmés par ceux de BIOZZI, HALPERN et coll., 1957, l'excitation la plus notable étant produite par le diéthylstilboestrol et le benzoate d'oestradiol (NICOL, WARE et coll., 1958).

Une étude de la configuration moléculaire de ces substances, naturelles ou synthétiques, a mis en évidence une relation directe entre la formule chimique et l'effet sur le S. R. E. BILBEY et NICOL (1962) ont montré que les stimulants synthétiques les plus puissants possédaient certains traits communs :

1/ Deux groupes p. hydroxyphényl sur deux atomes de carbone adjacents,

2/ Une insaturation,

3/ Une absence d'atomes d'hydrogène sur les carbones $\alpha$ et $\beta$.

La stimulation par les oestrogènes a pour effet, outre une meilleure résistance de l'organisme aux infections expérimentales (NICOL, CORDINGLEY et coll., 1962), une bien plus grande capacité pexique du S. R. E. vis-à-vis des particules colloïdales injectées.

Enfin, la suppression de l'hypophyse ou des surrénales dont certaines hormones inhibent le S. R. E. peut se traduire par une stimulation de ce dernier ainsi que le prouve l'expérience de REICHARD (1956) qui a montré une augmentation de la quantité d'or 198 fixé dans le foie et la rate après de telles ablations.

b) *Facteurs de dépression de l'activité pexique*

La dépression se traduira par une diminution des diverses fonctions du S. R. E. et en particulier de l'intensité colloïdopexique.

*- Nature physico-chimique du colloïde*

Nous avons vu que pour un même nombre de particules injectées, de diamètre déterminé, la nature du colloïde n'intervenait pas dans les phénomènes de colloïdopexie.

*- Etat physiologique du sujet*

On peut penser bloquer le S. R. E. en le saturant de particules colloïdales administrées en très large excès ; les macrophages bourrés de particules sont alors incapables d'absorber les particules administrées au cours d'une nouvelle injection.

WEIKEL et LUSKY (1956) ont montré que la phagocytose du phosphate ($^{32}P$) de chrome administré au Lapin était fortement diminuée lorsque le S. R. E. était bloqué par un traitement préalable avec de la polyvinyl-pyrrolidone.

En réalité il semble que cette opinion doive être nuancée car le blocage des cellules du S. R. E. par un colloïde vis-à-vis d'un autre colloïde nécessite que les deux sols aient des propriétés de surface identiques (MURRAY, 1963). Ainsi la vitesse d'épuration sanguine d'un colloïde tel que l'encre de chine stabilisée par de la gélatine diminue lorsqu'on injecte au préalable une solution gélatineuse (HALPERN, 1957).

Par contre deux colloides de nature différente peuvent être phagocytés à la suite l'un de l'autre par la même cellule réticulo-endothéliale. HALPERN, BIOZZI et coll. (1958), après injection successive de solutions colloidales de carbone et d'albumine iodée $^{131}I$, ont retrouvé les deux types de particules dans les macrophages. On comprend alors pourquoi les essais thérapeutiques de blocage du

S. R. E. par injection d'un colloïde visant à modifier le destin des métabolites anormaux, lors de certaines maladies par surcharge, n'aient pas été couronnés du succès espéré. Bien plus le "blocage" du S. R. E. peut conduire à son excitation en provoquant la prolifération de certaines cellules après injection du matériel phagocytable. Ainsi l'injection de colorants vitaux entraîne la mobilisation de cellules endothéliales en repos sous forme de monocytes par exemple (DELABARRE, 1952).

Il est aussi possible d'inhiber le S. R. E. en supprimant un organe riche en éléments histiocytaires. Si l'on ne peut songer à supprimer le foie, des essais ont été effectués en réalisant une splenectomie (THOMAS, 1949). Contrairement au résultat attendu, l'élimination de la rate stimule fortement le S. R. E. et en particulier les cellules de Küpffer du foie.

Comme nous l'avons vu, l'administration d'un premier produit ou une lésion organique peuvent gêner la captation par les macrophages d'un colloïde injecté ultérieurement. Cette inhibition du S. R. E. n'est cependant que transitoire car il s'ensuit une excitation du S. R. E. qui se traduit par une prolifération des éléments réticulo-endothéliaux et de ce fait même par une augmentation de la capacité pexique de l'appareil histiocytaire.

Quelques substances chimiques sont susceptibles de bloquer le S. R. E. Parmi celles-ci nous citerons les corticoïdes (BILBEY et NICOL, 1958), groupe caractérisé par une similitude dans leur structure moléculaire, et les anticoagulants qui bloquent la synthèse de la prothrombine réalisée par le S. R. E. ADLERCREUTZ et PETTERSON (1963) ont montré que chez les malades sous traitement anticoagulant, la fixation de l'or colloidal radioactif par le S. R. E. était nettement diminuée.

Enfin, au cours de certains états pathologiques on peut observer un blocage du S. R. E. Si chez la Souris, au cours du développement de diverses tumeurs et leucémies spontanées (BIOZZI, STIFFEL et coll., 1959) (OLD, BENACERRAF et coll., 1961) les auteurs n'ont pas trouvé de modification de l'activité du S. R. E., FOUSSARD-BLANPIN et coll. (1965) ont constaté que l'inflammation provoquée par du Kaolin, ou tout autre agent inflammatoire, était moindre chez les Rats cancéreux que chez les sujets sains. L'activité réticulo-endothéliale serait donc très ralentie chez les porteurs de tumeurs. Cette conclusion concorde avec les expériences de GRECO, SPINA et coll. (1962) qui ont montré, à l'aide de solutions colloïdales d'or 198, une diminution de la granulopexie chez les sujets souffrant de néoplasies. Le S. R. E. serait en quelque sorte bloqué ou en état de dépression. La propriété phagocytaire n'est pas exclusive du S. R. E. En effet, la microscopie électronique a permis de montrer que toute cellule était capable de fixer à doses infinitésimales les colorants ; et d'autre part l'on sait que certaines cellules du rein, les athrocytes, possèdent cette propriété pexique tout en étant dénuées des autres propriétés caractérisant les éléments histiocytaires.

En résumé nous avons défini le S. R. E. sur des bases anatomiques et surtout physiologiques en insistant sur la fonction pexique de ce système qui en est une propriété caractéristique directement influencée par les modalités du transport sanguin des colloïdes.

CHAPITRE III

# PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES RADIOCOLLOIDES

Connaissant les caractéristiques d'un colloïde hydrophobe et les conditions requises pour lui conserver sa stabilité il nous est dès lors possible de suivre son devenir lorsqu'il est administré dans l'organisme. Nous verrons que ses sites de localisation résultent des interactions avec les histiocytes de l'organisme. Mais avant d'atteindre les cellules fixatrices les colloïdes sont véhiculés dans le circuit sanguin. Nous chercherons alors à déterminer le rôle des protéines sériques dans le transport des colloïdes et tout particulièrement de l'or colloïde après administration par voie endoveineuse.

## I - LOCALISATION DES RADIOCOLLOIDES DANS L'ORGANISME

La méthode la plus directe pour étudier la répartition d'un radiocolloïde dans l'organisme est de l'introduire dans le courant circulatoire. Mais d'autres modes d'administration, que nous analyserons ensuite, conduisent à des localisations différentes qui dépendent des possibilités de migration des particules à travers diverses barrières physiologiques et de l'abondance des histiocytes autour du point d'injection. Nous verrons successivement, ainsi que le propose MULLER (1965), la localisation des colloïdes après injection endovasculaire, endocavitaire ou infiltration interstitielle.

### A - Voie endovasculaire

Depuis les travaux de DOBSON et JONES (1952) qui ont injecté par voie intraveineuse du radiophosphate de chrome dans le but de mesurer le flux sanguin hépatique, on emploie couramment d'autres radiocolloïdes par la même voie notamment l'or 198 colloïdal afin de diagnostiquer ou traiter diverses affections.

Tout radiocolloïde injecté à l'Homme se répartit de manière hétérogène dans l'organisme. Bien qu'il soit difficile de chiffrer exactement la distribution dans les différents organes, on a pu montrer (ROOT, ANDREWS et coll., 1954) que ce sont le foie et la rate qui fixent l'essentiel du colloïde, respectivement 60 à 94 % et 5 à 16 % de la radioactivité (Tableau IV).

La scintigraphie, méthode de mesure par comptage externe, a confirmé ces résultats et permis l'exploration fonctionnelle du foie (STIRRETT, YUHL, et coll., 1954 ; DONATO, BECHINI et coll., 1959 ; LEGER, DESGREZ et coll., 1963), de la rate (CAROLI, 1961) et de la moëlle osseuse (LARSON, JONSSON, 1964). Les applications les plus importantes concernent la recherche des kystes, abcès, tumeurs et métastases, sachant que les lésions néoplasiques du foie ne fixent pas les colloïdes radioactifs.

Des études plus systématiques ont pu être effectuées chez diverses espèces animales par mesure de la radioactivité dans les divers organes après sacrifice.

HERVE et GOVAERTS (1951) ont étudié la répartition du phosphate ($^{32}P$) de chrome après administration intraveineuse chez le Lapin et ont montré l'importante accumulation de ce composé dans le foie, la rate et la moelle osseuse, les poumons accaparant une quantité moindre mais non négligeable du colloïde.

ZIYAEV (1964) a apprécié chez la même espèce animale la répartition de l'Argent colloïdal $^{110}Ag$ et montré l'affinité pour le foie et la rate. De même (Tableau IV) l'or colloïdal $^{198}Au$ se localise surtout dans le foie, la rate et la moelle osseuse chez le Lapin, le Cobaye et le Rat. Chez ces trois espèces animales le foie fixe 86 à 91 % de la radioactivité et la moelle osseuse 1,9 à 4,6 %. Toutefois la quantité retrouvée dans la rate est variable : si elle est de 5 % chez le Cobaye, elle n'est que de 0,038 % chez le Lapin et 0,54 % chez le Rat (BILLITERI, ROMEO et GASSO, 1963).

Tableau IV

Localisation dans l'organisme de l'or 198 colloïdal administré par voie I.V.
(en pourcentage de la dose injectée)

| Organes | ESPECES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Homme | Chien | Lapin | Cobaye | Rat |
| Foie | 60 à 94 (1) | 83 (2) | 87 (3) | 86 (3) | 91 (3)<br>92 à 97 (4) |
| Rate | 5 à 16 (1) | 2,2 (2) | 0,03 (3) | 4,95 (3) | 0,54 (3)<br>0,46 à 2,17 (4) |
| Moelle osseuse | | 4 (2) | 4,57 (3) | 2,85 (3) | 1,9 (3)<br>0,58 à 2,13 (4) |
| Poumons | 0,8 à 3,2 (1) | | 0,23 (3) | 0,05 (3) | 0,20 (3)<br>0,03 à 0,19 (4) |
| Muscle | | 0,03 (2) | 1,62 (3) | 0,93 (3) | 0,48 (3) |
| Reins | 0,05 à 0,24 (1) | | 0,17 (3) | 0,07 (3) | 0,14 (3)<br>0,15 à 0,36 (4) |

(1) ROOT, ANDREWS, KNISELEY, TYOR (1954)
(2) ZILVERSMIT, BOYD, BRUCER (1952)
(3) BILLITERI, ROMEO, GASSO (1963)
(4) COHEN (1965)

Enfin, des résultats similaires ont été obtenus par ZILVERSMIT (1952) chez le Chien et par COHEN (1965) chez le Rat.

Tous les auteurs s'accordent pour considérer que cette répartition reflète l'abondance des éléments histiocytaires dans les organes fixateurs. Mais d'autres facteurs tels que les caractéristiques physico-chimiques du radiocolloïde et l'état physiologique des organes peuvent intervenir. En ce qui concerne la taille des particules, ZILVERSMIT (1952) n'a pas trouvé chez le Chien de différence dans la répartition de l'or colloïdal dont la taille est comprise entre 10 et 27 mμ. COHEN (1966) constate le même taux de fixation dans les différents organes avec de l'or colloïdal de 5 mμ et de 30 mμ chez le Rat. On peut penser comme BIOZZI (1965) que la répartition d'un colloïde monodispersé est identique si la taille des particules est comprise entre 3 et 80 mμ. Lorsque la taille des particules est trop grande le taux de fixation dans les poumons est élevé ; les particules sont alors arrêtées dans les capillaires pulmonaires.

Les particules très petites sembleraient au contraire avoir une affinité plus importante dans la moelle osseuse que pour le foie et la rate (DOBSON, GOFMAN et coll., 1949).

Parmi les facteurs physiologiques il est évident que les altérations diverses du S.R.E. entraînent des modifications dans la répartition des colloïdes qui ont été mises à profit dans l'exploration fonctionnelle de cet important système (GASSO-ROMEO et coll., 1963).

En résumé on peut estimer que la répartition des radiocolloïdes administrés par voie intraveineuse est identique quelle que soit d'une part la nature de la solution colloïdale si la taille des particules est comprise entre certaines limites, et d'autre part l'espèce animale dont les tissus riches en éléments histiocytaires fixent les particules radioactives dans la proportion de 99 % (COHEN, 1961).

B - Voie endocavitaire

L'étude de la distribution d'un radiocolloïde injecté par voie intrapéritonéale ou intrapleurale peut être faite, comme dans le cas précédent, par prélèvement des différents organes après sacrifice de l'animal traité ou par détection externe du rayonnement chez l'Homme.

On conçoit que la répartition du radiocolloïde dans l'organisme sera fonction de la perméabilité des membranes de la cavité. En effet cette dernière, selon les caractéristiques physico-chimiques du radiocolloïde, retient une plus ou moins grande quantité des particules qui sont englobées par les éléments histiocytaires ou par les leucocytes alors que les particules non phagocytées sont résorbées et transportées par voie sanguine dans le foie, la rate et la moelle osseuse (de BACKER, PAHAUT, 1957). Nous verrons donc comment la répartition d'un radiocolloïde dépend de ses caractéristiques physico-chimiques et de l'état physiologique de la cavité où il est introduit.

a) Influence des propriétés physico-chimiques du radiocolloïde

La couche du colloïde protecteur, la nature et le diamètre des particules sont des facteurs intervenant dans la migration et la répartition du radiocolloïde dans les tissus.

LAHR, OLSEN et coll. (1955) ont ainsi montré que dans le foie de Lapin des particules de phosphate de chrome protégées par de la gélatine à 4 % étaient captées dans une proportion de 60 % alors que pour des particules identiques en suspension dans une solution de glucose à 30 %, la fixation était réduite à 8, 8 %. La couche de colloïde protecteur qui entoure les particules de la première préparation pourrait expliquer selon les auteurs les différences observées.

BELLION, BUCHI et coll. (1963) ont analysé le rôle de la taille et de la nature des particules dispersées dans une solution gélatineuse. Ils ont montré qu'un colloïde de phosphate de chrome à grosses particules (100 à 1 000 mμ) persiste dans la cavité abdominale à un taux nettement plus élevé qu'un colloïde de même nature de 20 à 40 mμ. Enfin, le taux endocavitaire de ce dernier reste supérieur à celui de l'or colloïdal isodiamétrique administré dans les mêmes conditions. Le sort d'un radiocolloïde injecté dans une cavité dépend donc de sa nature et de sa taille. La mobilisation sera d'autant plus importante que les particules seront de plus faible dimension. Les auteurs ont retrouvé une plus grande quantité de phosphate de chrome mobilisé, dans la cage thoracique et le diaphragme lorsque les particules étaient de taille moindre.

Une mobilisation identique du colloïde d'or de 30 mμ, préparé au C. E. A., à partir de la cavité péritonéale a été retrouvée par autoradiographie chez la Souris (COHEN, COSTEROUSSE et coll., 1964). Les images prouvent un drainage vers le foie et une fixation le long de la paroi des gros vaisseaux abdominaux et thoraciques. Des mesures quantitatives chez le Rat, 24 heures après administration du même colloïde d'or, ont confirmé la migration des particules à partir de la cavité péritonéale puisqu'une fraction importante de la radioactivité est retrouvée dans le foie (27 à 67 %), la rate (0, 69 à 1, 35 %), les poumons (0, 07 à 1, 8 %) et la veine cave.

b) Influence physiologique et pathologique du sujet

La répartition d'un radiocolloide après injection endocavitaire varie avec l'espèce animale, la position du sujet au cours de l'expérience, l'anesthésie, l'intégrité de la membrane séreuse. RUSZNYAK et coll. (1960) montrent en effet que l'adsorption des particules sur les parois cavitaires est rapide chez le Rat, plus lente chez le Cobaye, extrêmement lente chez le Chien et moyenne chez le Lapin. Elle semble de toute façon plus élevée chez l'animal que chez l'Homme (LAHR, OLSEN et coll., 1955).

La diffusion des particules non adsorbées est influencée par la position et les mouvements de l'animal. Ainsi après injection intrapéritonéale la migration des particules vers le diaphragme, siège préférentiel de l'adsorption, est accélérée en suspendant l'animal la tête en bas ; elle est au contraire ralentie par l'anesthésie qui compromet la mobilité du diaphragme (BELLION, BUCHI et Coll., 1963.

Dans le domaine pathologique les résultats ont surtout été obtenus chez l'Homme puisque l'injection intrapleurale ou intrapéritonéale de colloïdes radioactifs est une méthode devenue classique dans le traitement des pleurésies et ascites néoplasiques (HAHN, MENEELY et coll., 1958 - DYBICKI, BALCHUM et coll., 1959 - HOLBROOK, CHILDS, 1964 - BOTSFORD, 1964).

Chez le malade la migration semble moins importante puisque CONSTANT, MAISIN et coll. (1960), après avoir suivi l'activité du liquide d'épanchement, étudié les modifications des frottis cellulaires et estimé la répartition de l'or par mesures externes, concluent que 24 heures après l'injection endocavitaire, 99 % du radiocolloïde est déposé d'une manière assez homogène sur les séreuses. Une partie négligeable de la radioactivité diffuse dans le sang et les urines. Les auteurs ont montré par examen cytologique des liquides d'épanchement que les grains radioactifs étaient phagocytés par les macrophages dont certains empruntaient les voies lymphatiques pour atteindre les ganglions. Cette migration des colloïdes radioactifs dans le système lymphatique a d'ailleurs été mis à profit par MULLER pour tenter de barrer les voies lymphatiques aux cellules néoplasiques migratrices.

On voit donc que la répartition d'un radiocolloïde injectée par voie endocavitaire est fonction des caractéristiques physico-chimiques des particules et de l'état physiologique de la cavité. Pour une taille déterminée un radiocolloïde administré par voie endocavitaire diffusera vers le foie à partir d'une cavité saine alors qu'il se fixera à 99 % sur les séreuses péricavitaires lors de certaines affections pathologiques.

C - Infiltration interstitielle

L'infiltration interstitielle dont HAHN, GOODELL et coll. (1947), HAHN et CAROTHERS (1950) ont été les promoteurs, a pour but de réaliser chez l'Homme une irradiation locale *in situ* et suppose au départ que le radiocolloide reste au point d'injection ; mais très vite on s'est aperçu que la résorption lymphatique des dépôts pratiqués était toujours importante quelque soit le radiocolloïde employé. Elle a été constatée chez le Chien avec le phosphate de chrome radioactif (COOPER, BULKLEY et coll., 1954) chez l'Homme, avec l'yttrium 90 (KYKER, TORIELLO et coll., 1955) et avec l'or colloïdal (KERR, FLOCKS et coll., 1953 - FLOCKS, KERR et coll., 1954 - PIERQUIN, FISZER et coll., 1957 - FLOCKS, 1964).

SHERMAN, BONEBRAKE et coll. (1951), ALLEN, SHERMAN et coll. (1954), ont mesuré la radioactivité dans les ganglions après injection d'or colloïdal au niveau d'épithélioma du col utérin chez diverses malades. Ces auteurs ont constaté que tous les ganglions prélevés, même des iliaques externes étaient radioactifs. Une fixation identique de l'or colloïdal a été retrouvée par autoradiographie (FONTAINE, 1956). Pourtant, si les ganglions sains fixent de manière importante le radiocolloïde, les ganglions atteints par des métastases ne captent pas le colloïde sauf dans leur enveloppe périphérique et les parties restées saines. Cette particularité, notons-le, a permis de dépister les métastases ganglionnaires par injection de radiocolloïdes dont on recherche la migration sur les trajets lymphatiques (lymphographie) (WELLAUER, DEL-BUONO et Coll., 1963).

Ces observations cliniques ont été complétées par des études chez l'animal. Après injection de radiophosphate de chrome colloïdal au Rat à la face externe de la cuisse (CHEVALIER et BURG, 1958) ou dans les loges aponévrotiques et les muscles de la patte postérieure (COHEN, COSTEROUSSE et coll., 1964) on constate une grande discordance dans les résultats d'une expérience à l'autre. Il semble que les mouvements musculaires dûs à l'agitation de l'animal favorisent la circulation lymphatique et de ce fait font varier la migration des particules (WINKEL, 1965).

Toutefois d'après les résultats obtenus par COHEN à la suite d'injections intrapédieuses d'un colloïde défini de phosphate de chrome, on peut considérer qu'à la sixième heure les pattes injectées renferment encore une forte proportion de la radioactivité (58 à 67 %). Le reste de celle-ci est retrouvé dans les ganglions poplités (7,1 à 15,9 %) et les ganglions lombaires (5 à 11,1 %). La faible fraction de colloïde retrouvée dans le foie montre qu'il y a peu de mise en circulation sanguine du radiocolloïde. Une progression identique de l'or colloïdal injecté chez l'Homme dans le pied a été retrouvée jusqu'au foie par SAGE, SINHA et coll. (1964). Il y a saturation successive des différents nodules lymphatiques puis entrée des particules d'or dans le canal thoracique, les vaisseaux sanguins d'où ils sont finalement retirés par le processus de phagocytose des cellules réticulo-endothéliales du foie.

Signalons cependant que BERG et CRISTOPHERSON (1956) n'ont retrouvé aucune radioactivité dans le foie, la rate ou la moelle osseuse du Chien à qui ils avaient injecté de l'or colloïdal par voie interstitielle, la progression du colloïde s'arrêtant aux ganglions lymphatiques.

Ces divergences seraient peut être dues à l'insuffisance des doses injectées pour saturer les ganglions lymphatiques.

En résumé on peut dire qu'à chacune des voies d'administration correspond un comportement biologique d'un type particulier avec des variantes qui dépendent des propriétés physico chimiques du colloïde : composition chimique, taille des particules, nature du protecteur, etc... (COHEN, COSTEROUSSE et coll., 1964).

En ce qui concerne la voie d'administration :

1/ Par voie intraveineuse le colloïde est épuré du sang et fixé dans les organes riches en éléments histiocytaires (foie, rate, moelle osseuse) à condition toutefois que la taille des particules soit comprise entre 3 et 80 mμ.

2/ Par voie intracavitaire le colloïde est résorbé par les cavités saines et il est retrouvé ultérieurement dans le S. R. E. Par contre dans les cavités inflammées il y a une fixation importante par le S. R. E. des cavités (macrophages) situé dans le tissu d'inflammation.

3/ Par voie interstitielle la migration est faible ; elle se fait par voie lymphatique ; le colloïde est retrouvé dans les ganglions et, en petite quantité, dans le foie.

## II - TRANSPORT SANGUIN DES COLLOIDES D'OR

De nombreuses revues ont été consacrées à l'étude du transport des composés chimiques par les protéines plasmatiques (GOLDSTEIN, 1949 - SCATCHARD, HUGUES et coll., 1954 - WELIN, 1964).

Nous ne reprendrons pas les résultats obtenus mais tirerons les quelques conclusions générales qui s'en sont dégagées. Ensuite nous envisagerons dans quelle mesure ces résultats sont applicables au domaine du transport des colloïdes par les protéines plasmatiques en insistant particulièrement sur l'or colloïdal.

### A - Données actuelles sur le transport de diverses substances par les protéines plasmatiques

Les protéines plasmatiques qui sont des colloïdes hydrophiles peuvent se combiner à des produits normalement ou pathologiquement présents dans le milieu sanguin et à ceux qui y sont parvenus à la suite d'une intoxication ou d'un acte thérapeutique. Bien des substances cependant sont incapables de se lier avec les protéines. Parmi les électrolytes citons le sodium, les chlorures, le strontium (GUERIN, 1965) et le chrome 51 sous forme hexavalente qui est entièrement fixé par les hématies ; parmi les constituants de l'organisme la thiamine et la riboflavine restent sous forme libre dans le plasma (RAOUL, 1965) ainsi d'ailleurs que les hexoses ; enfin dans le domaine des médicaments, les substances à action brève, les dérivés de conjugaison ou les métabolites hydrosolubles, sont en général peu fixés.

Il ne faut donc pas chercher a priori une liaison des protéines avec toute substance introduite dans l'organisme. Cependant lorsque celle-ci a lieu, elle se fait selon des modalités variables.

L'affinité des diverses fractions protéiniques est différente selon les substances. Il semble cependant que la fixation soit préférentielle sur les albumines puis viennent par ordre d'affinité décroissante les alpha et les bêta globulines et enfin les gamma globulines. La capacité de fixation dépend donc des propriétés physico-chimiques des protéines (poids moléculaire, configuration spatiale, nombre et position des groupements fonctionnels acides, amines ou autres).

Certaines substances physiologiques sont parfois liées à des supports protéiques spécifiques. Ainsi le fer est transporté par la sidérophylline qui appartient à la fraction des $\beta$ globulines, le cuivre est lié à la céruloplasmine qui est l'un des constituants des $\alpha_2$ globulines. Cette dernière liaison, notons-le, nécessite l'intervention du foie, le cuivre ionique étant véhiculé par les albumines (JEROME, 1965).

Des protéines spécifiques assurent aussi le transport des hormones thyroïdiennes et des corticoïdes. La triiodo ($T_3$) et la tétraiodotyronine ($T_4$) sont fixées par trois protéines qui appartiennent à la préalbumine (Thyro-Binding-Préalbumine : TBPA), à l'albumine (TBA) et aux globulines (TBG) (ROCHE et SALVATORE, 1965).

De même, le cortisol est fixé dans une large proportion par une glyco-protéine qui appartient aux $\alpha_1$ globulines et dénommé transcortine (SLAUNWHITE et SANDBERG, 1959).

Dans d'autres cas la spécificité est toute relative et elle varie en fonction des doses de produit mis en présence des protéines. A l'aide de chrome trivalent marqué au $^{51}Cr$ il a été possible de montrer qu'à faible concentration (1 à 2 $\mu$g de chrome par gramme de protéines) les $\beta$ globulines fixent la majeure partie du chrome, par contre pour des concentrations plus élevées (40 $\mu$g de chrome par gramme de protéines) la fixation tend à s'égaliser entre les différentes globulines, la sérum albumine demeurant peu marquée (COHEN, WEPIERRE et coll., 1965). Un phénomène identique a été observé pour le fer, à l'aide du fer 59, ajouté en excès à du sérum (WURHMANN et JASINSKI, 1953).

Cette prise en charge des composés chimiques par les protéines sanguines entraîne un certain nombre de conséquences :

1/ Elle permet le transport de composés insolubles dans l'eau du point d'inoculation jusqu'aux zones d'action physiologique,

2/ Les composés liés aux protéines ne sont plus diffusibles à travers les capillaires normaux et les membranes cellulaires et, de ce fait, sont inactifs. Ce n'est qu'à la suite de leur libération qu'ils sont susceptibles d'agir ; de même un médicament lié n'est pas métabolisé.

3/ La quantité de substance liée dépend de la vitesse de formation et de la vitesse de destruction de la liaison et, de ce fait, obéit à la loi d'action de masse.

Si P représente les protéines, S la substance et PS le complexe protéine-substance, la vitesse de formation de PS étant $V_1$, celle de sa destruction étant $V_2$.

$$P + S \underset{V_2}{\overset{V_1}{\rightleftharpoons}} PS$$

à l'équilibre les concentrations P, S et PS sont telles que :

$$\frac{[P] \times [S]}{[PS]} = K \text{ (Constante de dissociation)}$$

Si K est très élevé la liaison est labile, si K est très faible la liaison est très intense ou même irréversible.

Pour que l'on puisse parler de transport il est nécessaire que la substance transportée soit libérée au moins en faible quantité au niveau des lieux d'action, il est donc indispensable que cette liaison soit relativement labile du type : liaisons de Van Der Waals, liaisons hydrogène, liaisons électrostatiques (GUILLOT, 1965).

B - Transport des colloïdes

Le problème du transport des colloïdes par les protéines plasmatiques est particulier : il s'agit d'un transport colloïde-colloïde. En effet, les protéines plasmatiques sont des colloïdes hydrophiles ; elles auront à transporter d'autres colloïdes hydrophiles ou des colloïdes hydrophobes dont les particules sont très grosses par rapport aux protéines et qui sont souvent protégées et stabilisées par un colloïde protecteur. Dans ce dernier cas le problème sera essentiellement l'interaction de la protéine plasmatique et de la particule protégée par son protecteur. Les interactions ont rendu l'analyse du phénomène difficile et, de ce fait, nos connaissances sont encore très limitées dans ce domaine.

Les particules colloïdales introduites dans le courant circulatoire, comme nous l'avons vu précédemment, sont captées a plus ou moins brève échéance par le S. R. E. Pour certains (BENHOLD et SEYBOLD, 1952) cette colloïdopexie ne pourrait s'exercer que sur des particules englobées dans les protéïnes, mais les travaux dans ce sens sont très peu avancés et les seuls résultats positifs concernent le transport plasmatique.

OTT, en 1953, a séparé par électrophorèse en veine liquide du plasma humain incubé *in vitro* avec diverses solutions colloïdales hydrophobes dont la taille des particules variait entre 10 et 50 mμ (encre de chine, or colloïdal, sol de bleu de Prusse). Dans tous les cas seules les $\alpha_2$ globulines possèdent la faculté de liaison ; mais l'incubation avec diverses fractions protéïques isolées montre que la liaison peut avoir lieu avec d'autres protéïnes ; elle croît en passant de l'albumine aux β globulines puis aux $\alpha_1$ et enfin aux $\alpha_2$ globulines.

D'après ces résultats la nature chimique du colloïde ne semble pas intervenir dans les phénomènes d'interaction avec les protéïnes plasmatiques.

BONTOUX (1961) dans le but d'étudier la fonction du colloïde protecteur dans les phénomènes de transport de l'or colloïdal a analysé par diffusion lumineuse d'interaction gélatine-protéïnes sanguines. L'auteur conclut que les γ globulines et la sérum albumine n'interagissent pas avec la gélatine mais que les α et β globulines, dans les conditions expérimentales choisies, forment avec ce polyélectrolyte un complexe soluble.

La gélatine, du fait de son affinité pour les α et les β globulines, modifie donc éventuellement les caractères de la liaison qu'une particule pourrait avoir avec les protéïnes si elle ne protégeait pas cette dernière.

Les faits montrent qu'il est nécessaire de connaître avant toute expérimentation les caractéristiques du colloïde étudié.

C - Transport de l'or colloïdal

L'introduction dans l'organisme d'or colloïdal stabilisé à la gélatine ne peut donc plus évoquer a priori un problème d'interaction métal-protéïne, mais un problème d'interaction protéïne-protéïne. En effet on n'injecte pas dans l'organisme des micelles d'or libre avec des groupements ionogènes

prêts à réagir avec les protéines rencontrées mais un colloïde stabilisé par une quantité importante de gélatine (3 % en gélatine pour 3,5 mg % d'or pour l'or colloïdal fabriqué au C.E.A.). Cette gélatine bloque, tout au moins en grande partie, les éléments actifs de la particule comme l'a montré BONTOUX (1961). Il est donc logique de penser que l'or colloïdal radioactif, stabilisé par de la gélatine, mélangé au sérum sera retrouvé après fractionnement électrophorétique au niveau des $\alpha$ et des $\beta$ globulines, lieu de fixation de la gélatine.

Si une telle hypothèse concorde avec les travaux de SIMON (1954) elle ne correspond pas exactement aux résultats d'autres auteurs. SIMON, par électrophorèse, retrouve l'or colloïdal radioactif, mélangé *in vitro* à du plasma humain normal ou injecté à l'Homme, au niveau des $\alpha$ et $\beta$ globulines ; les autres fractions protéiques étant dénuées de radioactivité.

MURRAY (1956) par contre ne retrouve l'or colloïdal qu'au niveau des $\alpha_2$ globulines mais il est nécessaire pour obtenir la migration électrophorétique du colloïde dilué dans l'eau et mélangé à du sérum humain de lui incorporer une certaine quantité de gélatine. Ces résultats retrouvés par le même auteur chez le Rat montrent que la liaison résulte surtout d'une interaction gélatine-protéïnes ; la gélatine servant de lien entre les particules d'or et les protéïnes sériques.

Des divergences encore plus importantes sont notées après injections intrapéritonéales d'or colloïdal chez l'Homme cancéreux (BELLION, GHEMI et Coll., 1957). Dans ces conditions la radioactivité se fixe sur les albumines et les $\alpha_1$ globulines. Il semble que la fixation sur les albumines soit attribuable à l'or soluble comme l'ont montré GALLE, RAYNAL et coll. (1965). En effet du chlorure d'or 198 mis à incuber avec du sérum se fixe sur les albumines alors que l'or colloïdal radioactif est retrouvé en majeure partie sur les globulines.

Ces divergences ne semblent pas attribuables à la quantité d'or mise en présence du sérum puisque de l'or colloïdal Amersham injecté au Lapin par voie endoveineuse à des doses dans le rapport de 1 à 10 (40 et 400 µCi/Kg d'animal) est retrouvé au niveau des $\alpha_1$ globulines (GIORDANO, RINALDIS et coll., 1962).

Néanmoins les méthodes utilisées sont différentes d'un auteur à l'autre tout au moins en ce qui concerne le mode d'injection, l'origine de l'or, sa dilution avant l'administration.

De toute façon les résultats obtenus (Tableau V) en ce qui concerne le transport de l'or colloïdal par les protéïnes plasmatiques sont discordants même en admettant que la radioactivité retrouvée au niveau des albumines soit due à l'or soluble (EKHOLM, 1951).

De plus, il est difficile à partir des données actuelles de la littérature, de dégager l'influence des caractères physico-chimiques des grains d'or colloïdal sur leur comportement dans l'organisme et encore plus sur leur transport dans le flux sanguin, où interviennent, outre les protéïnes, les éléments mobiles du S.R.E.

Tableau V

Transport de l'or colloïdal par les fractions protéiques

| | Albumine | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ Globulines |
|---|---|---|---|---|---|
| Homme (1) | | + | + | + | |
| Homme (2) | | | + | | |
| Homme (3) | (+) | + | | | |
| Homme (4) | (+) | + | + | + | + |
| Rat (2) | | | + | | |
| Lapin (5) | | + | | | |

(1) SIMON N. (1954)
(2) MURRAY I.M. (1956)
(3) BELLION B., GHEMI F., TURGO G. (1957).
(4) GALLE P., RAYNAL M., TUBIANA M. (1965)
(5) GIORDANO D., RINALDIS P. de, SALAMANNA S. (1962)

# DEUXIÈME PARTIE

# TRAVAUX PERSONNELS

Nous nous proposons, à l'aide des moyens d'études ci-après, de démontrer une liaison éventuelle des protéines avec l'or colloïdal, ce qui pourrait expliquer le mode de transport de ce dernier dans l'organisme.

Dans ce but nous avons d'abord étudié le comportement des colloïdes d'or utilisés, traités par les différentes techniques de fractionnement.

Puis, pour analyser les caractères et l'éventualité de la liaison, nous avons fait varier les paramètres :

- Utilisation de colloïdes d'or dont la taille des particules est variée,

- Recherche de protéines sériques d'origine sinon de nature différente.

Nous envisagerons donc successivement :

1/ des mélanges *in vitro* et *in vivo* des divers colloïdes avec le sérum de diverses espèces animales réputées saines,

2/ des mélanges *in vitro* et *in vivo* des mêmes colloïdes avec le sérum ou les liquides exsudatifs de sujets malades naturellement ou expérimentalement.

Enfin, dans un dernier chapitre nous discuterons de l'ensemble de nos résultats et essayerons de les comparer aux données actuelles.

CHAPITRE IV

# MÉTHODES D'ÉTUDES ET COMPORTEMENT DES COLLOIDES D'OR VIS-A-VIS DE CES TECHNIQUES

Les recherches sur les phénomènes de transport par les protéines du plasma sanguin mettent en oeuvre des méthodes basées d'une part sur un changement des propriétés du corps véhiculé : mesure de solubilité, analyse de partage, équilibre de dialyse, ultrafiltration, filtration sur gel de dextrane, ultracentrifugation, échanges d'ions, polarographie, électrophorèse, spectrophotométrie, mesure de l'activité biologique, et d'autre part sur un changement des propriétés de la protéine vectrice : précipitation, électrophorèse, spectrophotométrie, potentiométrie (MEUNIER, 1961 - WELIN, 1964). Dans ces méthodes, la difficulté réside dans la détection de la molécule transportée. Pour notre part cet écueil n'existe pas puisque nous utilisons le colloïde d'or radioactif.

L'emploi des radioéléments en effet permet de suivre une molécule ou une particule avec facilité et, de plus, abaisse de façon considérable les limites de la détection (on peut mettre en évidence $10^{-5}$ à $10^{-6}$ microgramme à condition de disposer de composé d'activité spécifique suffisante (ROCHE, LISSITZKY et coll., 1959). De telles limites permettent d'ajouter le traceur à très faibles doses sans perturber les équilibres biologiques.

De toutes ces méthodes aucune n'est cependant idéale pour notre travail si nous voulons à la fois respecter l'intégrité du colloïde et les liaisons fragiles or-gélatine-protéines sériques.

En effet l'or colloïdal est un colloïde hydrophobe protégé par de la gélatine. Comme pour tous les colloïdes hydrophobes on peut craindre de le détériorer par dilution, addition d'électrolytes, variation de pH ou encore action de champs électriques.

Les liaisons or colloïdal-protéine sont également labiles et peuvent de ce fait être modifiées par les facteurs physiques précédents.

Pour éliminer autant qu'il se peut ces inconvénients nous avons associé plusieurs méthodes en choisissant pour chacune d'elles les conditions les moins brutales et nous avons vérifié le comportement des radiocolloïdes.

Au cours de notre travail nous avons essentiellement utilisé trois procédés :

1/ Une technique de sédimentation suivie d'autoradiographie destinée à prouver l'affinité de l'or pour les protéines plasmatiques comparativement aux éléments figurés du sang (leucocytes, hématies),

2/ Deux techniques d'électrophorèse destinées à séparer les fractions plasmatiques afin de préciser le lieu de fixation de l'or colloïdal,

3/ Une technique de filtration sur gel de dextrane qui permet de différencier l'or colloïdal libre de l'or colloïdal lié aux protéines.

## A - DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ETUDES

### I - Sédimentation-autoradiographie

Dans un premier temps nous avons cherché à avoir la répartition de l'or colloïdal dans les hématies, les leucocytes et le plasma. Une méthode de séparation de ces trois fractions suivie d'un comptage est difficilement applicable aux globules blancs. Nous avons donc utilisé une méthode d'autoradiographie appliquée au culot globulaire (WEPIERRE, 1963) selon la technique de COHEN et DELASSUE (1959).

Principe

Le sang incubé avec le radioélément est centrifugé, congelé puis débité au microtome à congélation en coupes perpendiculaires à la surface de sédimentation. Ces coupes sont desséchées à -20°C, puis appliquées sur un film radiographique qui révèle la localisation du composé marqué dans les diverses fractions sanguines.

Technique

Le sang hépariné, maintenu en contact avec l'or colloïdal *in vitro* et *in vivo*, est centrifugé dans un tube de matière plastique à 2 700 tours/minute pendant dix minutes puis congelé par immersion dans l'azote liquide à -195°C. Les blocs obtenus sont conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur à -20°C.

Après ce délai la préparation congelée est sortie du réfrigérateur, débarassée du tube en matière plastique et fixée sur la platine du microtome à congélation. Sur la partie supérieure du bloc, égalisée à l'aide du rasoir, on dépose une goutte d'éther de pétrole pour éviter la formation de givre, et on colle rapidement un ruban adhésif d'acétate de cellulose (Scotch-tape). Des coupes de 40 µ sont effectuées, à l'aide du contenu refroidi par un jet de gaz carbonique, selon un plan perpendiculaire à la sédimentation. La coupe collée sur le ruban est rapidement transportée dans un réfrigérateur à -20°C où elle se dessèche en trois jours environ par sublimation de l'eau qu'elle contient.

Les coupes desséchées sont mises au contact d'un film radiographique (Kodirex monocouche) durant un temps, déterminé par étalonnage, à -30°C. Le film impressionné est enfin révélé selon les techniques classiques.

La mesure de la densité optique au niveau des hématies, des leucocytes et du plasma permet d'apprécier la concentration radioactive dans chacune de ces fractions.

Cette méthode nous permettra de justifier les études concernant le transport des colloïdes d'or par les protéines sériques.

II - Fractionnement électrophorétique du sérum mis en contact avec l'or colloïdal

Afin de déterminer la fraction protéique du sérum sanguin qui fixe l'or colloïdal mis à son contact, nous avons cherché une méthode qui concilie une bonne séparation des protéines et une conservation de l'état colloïdal de l'or.

Les techniques de précipitation fractionnée dénaturent les colloïdes et en particulier ceux qui sont protégés par une protéine. Tel est le cas de l'or colloïdal protégé par la gélatine. Nous avons donc adopté l'électrophorèse sur support. Cette méthode donne un fractionnement satisfaisant du sérum sans être pour autant idéale pour la réalisation de notre travail. En effet, la différence de potentiel, établie entre les deux extrémités du support, et la nature du tampon ne seront pas sans agir sur le colloïde et sur les liaisons or colloïdal-protéines sériques. De ce fait nous avons effectué les migrations sur des supports différents et avec des tampons variés.

Principe

Après incubation d'or colloïdal *in vitro* avec du sérum ou après injection *in vivo* à l'animal, le sérum sanguin est soumis à une séparation électrophorétique.

Le repérage des protéines est obtenu par coloration au noir amido ; la répartition de la radioactivité est appréciée par autoradiographie des bandes d'électrophorèse. La comparaison, après lecture densitométrique, de l'électrophorégramme et de l'autoradiogramme précise l'affinité des fractions protéiques pour l'or colloïdal.

Technique

Nous verrons successivement les deux techniques que nous avons utilisées :

1/ Electrophorèse sur papier

2/ Electrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux ou "cellogel".

1/ *Electrophorèse sur papier*

*Appareillage*

L'appareil(•) est constitué par un ensemble parallélépipédique qui comporte latéralement deux cuves, destinées à recevoir une solution d'électrolytes, dans lesquelles plongent les extrémités des bandes de papier disposées sur un chevalet. En outre chaque cuve comporte une électrode impolarisable séparée de la bande par une paroi perforée qui évite les mouvements de diffusion liquidiens. Les électrodes sont reliées à un dispositif redresseur et stabilisateur d'un courant de 120 volts. Un potentiomètre permet de maintenir la tension constante.

*Conduite de l'électrophorèse*

La solution conductrice utilisée est le tampon, type Michaelis, cité par WUNDERLY (1961), de force ionique (μ) 0,1 (veronal sodique : 19,6 g - acétate de sodium : 12,9 g - eau distillée qsp 2 litres - ajusté à pH 8,6 par addition HCl (d : 1,19). Le tampon est versé dans les cuves et le niveau du liquide dans chacune d'elles est égalisé par siphonnage. Des bandes de papier Whatman n° 1, larges de 3 cm et longues de 18 cm, imprégnées préalablement du tampon, tendues sur le support, sont alors placées dans l'appareil que l'on recouvre d'un couvercle.

Le courant est établi (120 Volts, soit 4 Volts/cm) pendant 20 minutes afin d'équilibrer les mouvements liquidiens dans les bandes, lesquels pourraient perturber ultérieurement la migration. Après ce délai on dépose à 3 cm de l'extrémité cathodique des bandes les différents échantillons sur une longueur de 2 cm (sérum humain normal, solution colloïdale d'or 198 ou encore mélange du sérum et de l'or colloïdal). Dans ces conditions la durée de migration est de 16 à 18 heures et l'intensité du courant est d'environ 0,6 mA par bande.

Les électrophorégrammes sont enlevés de la chambre humide et séchée à l'étude à 100°C.

*Préparations des autoradiographies*

Les électrophorégrammes sont appliqués à l'obscurité sur un film radiographique Kodirex monocouche et maintenus en contact pendant une durée qui est fonction de la concentration radioactive des solutions "ensemencées" ; par exemple pour des concentrations radioactives de 0,5 μCi/ml, 5 μCi/ml ou 50 μCi/ml les temps de contact sont respectivement de 60 heures, 6 heures et 36 minutes.

Les films exposés sont révélés par les procédés ordinaires avec des produits Kodak(••).

*Coloration des électrophorégrammes*

Après développement des films radiographiques les électrophorégrammes sont colorés par une solution méthanolique saturée d'amido-Schwarz pendant quinze minutes. Le colorant non fixé sur les protéines est éliminé par lavage dans un bain de méthanol, d'acide acétique et d'eau (100 : 30 : 70) jusqu'à ce que le support soit complètement décoloré.

*Mesure de la densité optique de l'électrophorégramme et de son autoradiographie*

La bande colorée est rendue translucide par immersion de 4 à 6 heures dans un mélange d'huile de vaseline et de bromonaphtalène (4 : 1) ; elle est serrée entre deux lames de verre puis placée sous l'appareil de lecture (Titromatic Queré équipé d'un photomètre électrophorèse et d'un planimètre intégrateur(•••).

La densité optique le long de la bande, qui ne doit pas dépasser 0,8 pour qu'il y ait proportionnalité, est enregistrée automatiquement par un style inscripteur sur une feuille de papier millimétré. En ordonnées est inscrite la valeur des densités optiques, en abscisses le déplacement de la bande exprimé en millimètres.

L'enregistrement de la densité optique de l'autoradiogramme est exactement superposé à celui de l'électrophorèse en s'aidant d'un repère radioactif qui, placé sur la bande avant l'exposition,

---

(•) Cuve SHANDON distribuée par Paris-Labo - Paris
Bloc Electrophorèse Paris-Labo - 400 Volts - Paris

(••) Révélateur Radio LX 24 Kodak
Fixateur Radio AL 4 Kodak

(•••) Appareil diffusé par les Laboratoires JOUAN - Paris - France

a impressionné le film. Les pics de densité sont décomposés en courbes gaussiennes et leur surface planimétrée.

Le rapport de chaque surface à la surface totale donne le pourcentage de chaque fraction protéïque et de chaque fraction radioactive.

2/ *Electrophorèse sur cellogel*

Cette méthode identique dans son principe à la précédente consiste à employer un autre support : le cellogel qui est l'acétate de cellulose gélatineux. Ce support présente l'avantage d'être plus homogène que le papier et de permettre un fractionnement des protéïnes en un temps réduit à quelques heures. Dans ces conditions les réactions électrolytiques qui modifient la composition du tampon sont minimes ce qui permet de simplifier l'appareil.

*Appareillage*

L'appareil(*) est constitué uniquement d'un bloc non conducteur partagé en deux compartiments qui contiennent chacun une électrode de platine. Les extrémités des bandes, placées sur un support, plongent dans chacune des cuves remplies également de tampon et fermées par un couvercle.

Outre le tampon type Michaelis (Veronal sodique, acétate sodique) déjà cité à propos des électrophorèses sur papier, nous avons utilisé le tampon de ARONSSON et GRONWALL (1957) (tris hydroxymethyl aminométhane 60,5 g ; acide éthylène - diamine tétracétique 6 g ; acide borique 4,6 g, eau distillée un litre, de pH 8,9 et de force ionique 0,08).

*Conduite de l'électrophorèse*

Les bandes de cellogel, conservées dans un mélange de méthanol et d'eau à parties égales, sont préparées par lavage de 10 à 15 minutes dans la solution tampon utilisée afin d'éliminer l'alcool. Elles sont de suite tendues horizontalement sur le cadre de manière à recevoir le dépôt sur leur face non brillante.

Le support est placé dans l'appareil et on établit une différence de potentiel de 120 Volts (7 Volts/cm) pendant vingt minutes comme pour les bandes de papier.

Les dépôts de 1 à 2 µl selon la nature de l'échantillon sont alors effectués avec micropipette sur une largeur de 1 cm à 3 cm à l'extrémité cathodique de la bande. Dans ces conditions le fractionnement des protéïnes est satisfaisant au bout de 2 heures 15 minutes.

*Coloration des électrophorégrammes*

Après ce délai les bandes humides sont aussitôt plongées pendant 2 minutes 30 dans le bain suivant : amido-schwarz : 0,5 g ; alcool méthylique : 40 ml ; eau distillée : 50 ml ; acide acétique : 10 ml ; qui fixe et colore les protéïnes.

Le colorant en excès est éliminé par lavages successifs à l'aide d'un mélange alcool méthylique, eau distillée, acide acétique, diacétonalcool (35, 50, 7, 10) jusqu'à décoloration complète du support.

Les électrophorégrammes humides sont étroitement appliqués sur des plaques de verre dégraissées pour pouvoir les sécher à l'étuve à 100°C (le diacétonalcool, composant du mélange de décoloration, permet d'obtenir un cellogel rigide translucide à cette température). Après refroidissement ils sont décollés de leur support de verre.

*Préparation des autoradiogrammes*

Des autoradiographies des électrophorégrammes sont préparées selon la technique que nous avons décrite à propos de l'électrophorèse sur papier.

*Mesure de la densité optique de l'électrophorégramme et de son autoradiographie*

La répartition des fractions protéïques et la distribution de la radioactivité le long des bandes sont estimées par enregistrement automatique de la densité optique à l'aide du Titromatic Quéré.

---

(*) Cuve électrophorèse type Köhn modèle AC/5
CHEMETRON - Milan - Italie - délivrée par SPETELEC - Paris

On détermine enfin le pourcentage de chaque fraction protéique et radioactive par rapport au pourcentage total.

- *JUSTIFICATION DE LA METHODE*

1/ *Electrophorèse sur papier*

a) Cette méthode simple et reproductible présente l'avantage d'autoriser l'exposition de l'électrophorèse non colorée sur le film. Une coloration avant la révélation de la radioactivité pourrait en effet entraîner une perte partielle de l'élément marqué par solubilisation.

b) Nous avons utilisé de préférence au liquide de lavage (alcool méthylique : 9 ; acide acétique : 1/ de GRASSMAN, HANNIG et KNEDEL (1951) un mélange méthanol, acide acétique et eau distillée préconisée par REBEYROTTE (cité par AGNERAY, WEPIERRE et PUISIEUX - 1959). Si le premier bain permet de révéler la gélatine contenue dans la solution colloïdale au niveau de la migration de cette dernière, cette coloration introduit une surcharge dans l'estimation de la fraction protéique qui lui est superposée. Par contre le mélange aqueux ne met pas en évidence la gélatine qui, partiellement hydrolysée au cours de la préparation du colloïde, est sans doute solubilisée dans l'eau du liquide de lavage.

c) Par suite de gradient électrique créé, la méthode électrophorétique peut entraîner la rupture des liaisons protéines sériques - or colloïdal. BONTOUX (1964) qui a mis en évidence les liaisons or ionique-gélatine insiste sur leur fragilité et considère qu'elles risquent d'être détériorées pour une force ionique supérieure à 0, 15. Pour éviter autant que possible ces détériorations nous avons donc conduit nos fractionnements avec une force ionique minimum (0, 1) et un voltage (4 Volts/cm) aussi faible que possible, compatibles avec une bonne séparation des fractions protéiques.

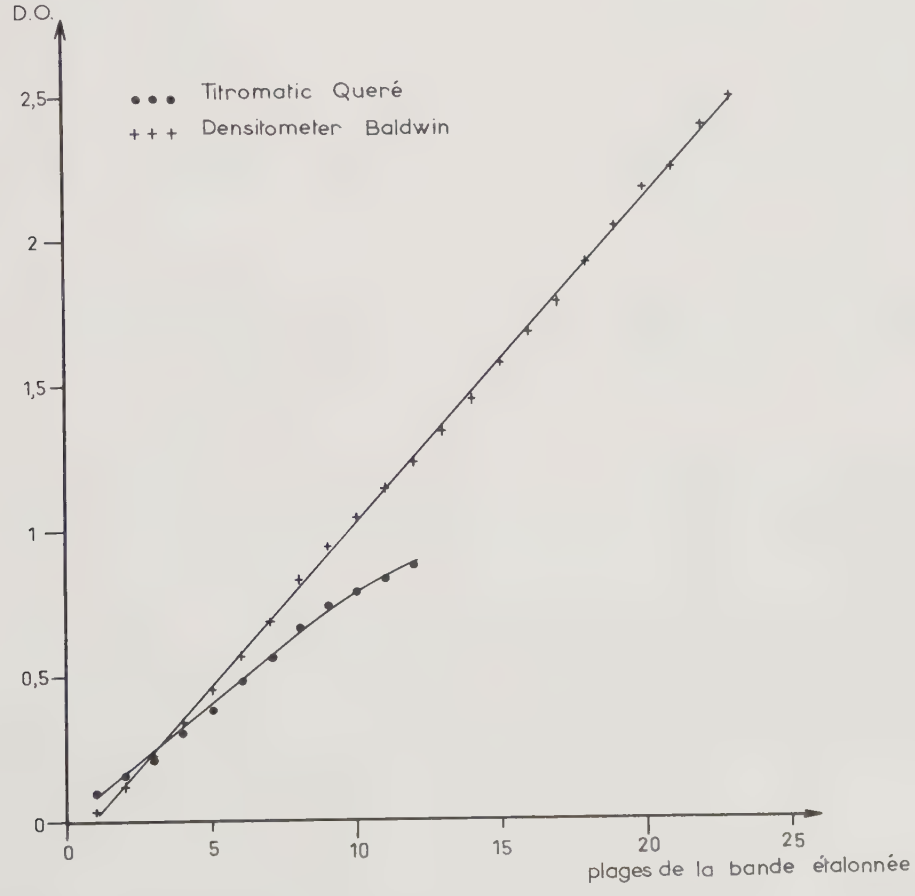



Figure 3 - Etalonnage de deux appareils pour lecture des densités optiques à l'aide d'une bande étalonnée (BALDWIN) type MND Merk 3.

d) Nous avons vu que la densité optique des bandes lues au photomètre ne devait pas excèder une valeur de 0,8 pour être assuré de la proportionnalité entre doses et densité optique (CHARLOT et BEZIER - 1955). Nous avons alors étalonné l'appareil utilisé. La figure 3 montre que les résultats ne sont pas exempts d'une erreur systématique même à une densité optique inférieure à 0,8. Cependant la précision obtenue nous paraît suffisante pour des études comparatives.

Malgré ces précautions la migration du colloïde d'or sur le papier n'est pas homogène ; elle se fait avec une trainée importante qui rend difficile l'interprétation des résultats. Le rôle adsorbant du papier vis-à-vis des protéines (WUHRMANN et WUNDERLY, 1961) et des grosses particules (AUDUBERT et MEND, 1957) souligne alors le rôle du support dans les phénomènes électrophorétiques observés.

2/ *Electrophorèse sur cellogel*

a) La méthode d'électrophorèse sur cellogel est beaucoup plus rapide que la précédente puisque la migration est terminée en 2 heures 15 minutes. Ainsi le colloïde est soumis moins longtemps à une différence de potentiel électrique et à l'action d'un tampon susceptible de le dénaturer. Effectivement, le colloïde d'or migre sur un même front sans laisser de trainées.

b) Nous avons employé simultanément le tampon Tris (ARONSSON et GRONWALL - 1957) et le tampon type Michaelis qui donnent des séparations protéiques satisfaisantes et qui permettront d'étudier l'influence éventuelle de ces tampons sur le respect des liaisons.

c) Du fait que les bandes au sortir des cuves ne peuvent être manipulées qu'après le traitement que nous avons décrit, il est nécessaire de les colorer et de les déshydrater avant de les exposer sur les films. Cette opération risque d'éliminer une partie du radioélément fixé sur le support. Nous avons vérifié l'absence d'une telle éventualité.

Pour cela nous avons effectué des dépôts de 1 µl d'or colloïdal radioactif sur deux bandes ; une a servi de témoin, l'autre a subi le traitement décrit ci-dessus. Puis chaque dépôt a été isolé, mis en solution dans un ml d'acétone et compté au scintillateur "à puits(*)". Les résultats montrent que les bandes traitées ne perdent pas plus de 9 % de la radioactivité déposée, qu'il s'agisse des solutions colloïdales $S_2$ ou $S_6$.

La méthode électrophorétique permet une séparation des fractions protéiques mais n'assure pas totalement le respect des liaisons or colloïdal-protéines ou l'intégrité du colloïde. Dans le but d'éliminer en partie ces inconvénients nous avons mis en oeuvre plusieurs techniques faisant appel à des supports et des tampons différents.

## III - Séparation par filtration sur gel de l'or colloïdal et des protéines sanguines

Nous avons fait appel à la filtration en colonne, sur gel de dextrane (séphadex), dans le but de mettre en évidence une interaction éventuelle or colloïdal-protéine sérique sans détériorer les liaisons.

### Principe

La filtration sur gel est une méthode chromatographique qui permet la séparation des molécules d'après leurs dimensions respectives. En effet, le gel de séphadex est constitué par des petites perles de dextran (polysaccharides), réticulé sous forme d'un réseau à trois dimensions plus ou moins fin, dont les pores se comportent comme un tamis séparant les molécules en fonction de leur taille.

De plus, les composés dont les dimensions sont supérieures à celles des pores traversent le gel sans pénétrer dans les grains (PORATH, FLODIN, 1963 - MUNIER, 1963).

Nous avons pensé que ce procédé nous permettrait de séparer les particules d'or colloïdal et les protéines plasmatiques dont les tailles respectives sont très différentes et de mettre en évidence une interaction éventuelle entre ces deux composés.

---

(*) Scintillateur NaI à puits 1" 3/4 × 2" qualité X (standard) délivré par BELIN, Rueil - Malmaison - France.

Appareillage

L'appareil figure 4) est constitué par :

1 - une colonne remplie de séphadex qui permet d'effectuer la séparation,

2 - un réservoir contenant l'éluant,

3 - un collecteur de fractions qui recueille l'éluat en quantité volumique déterminée.

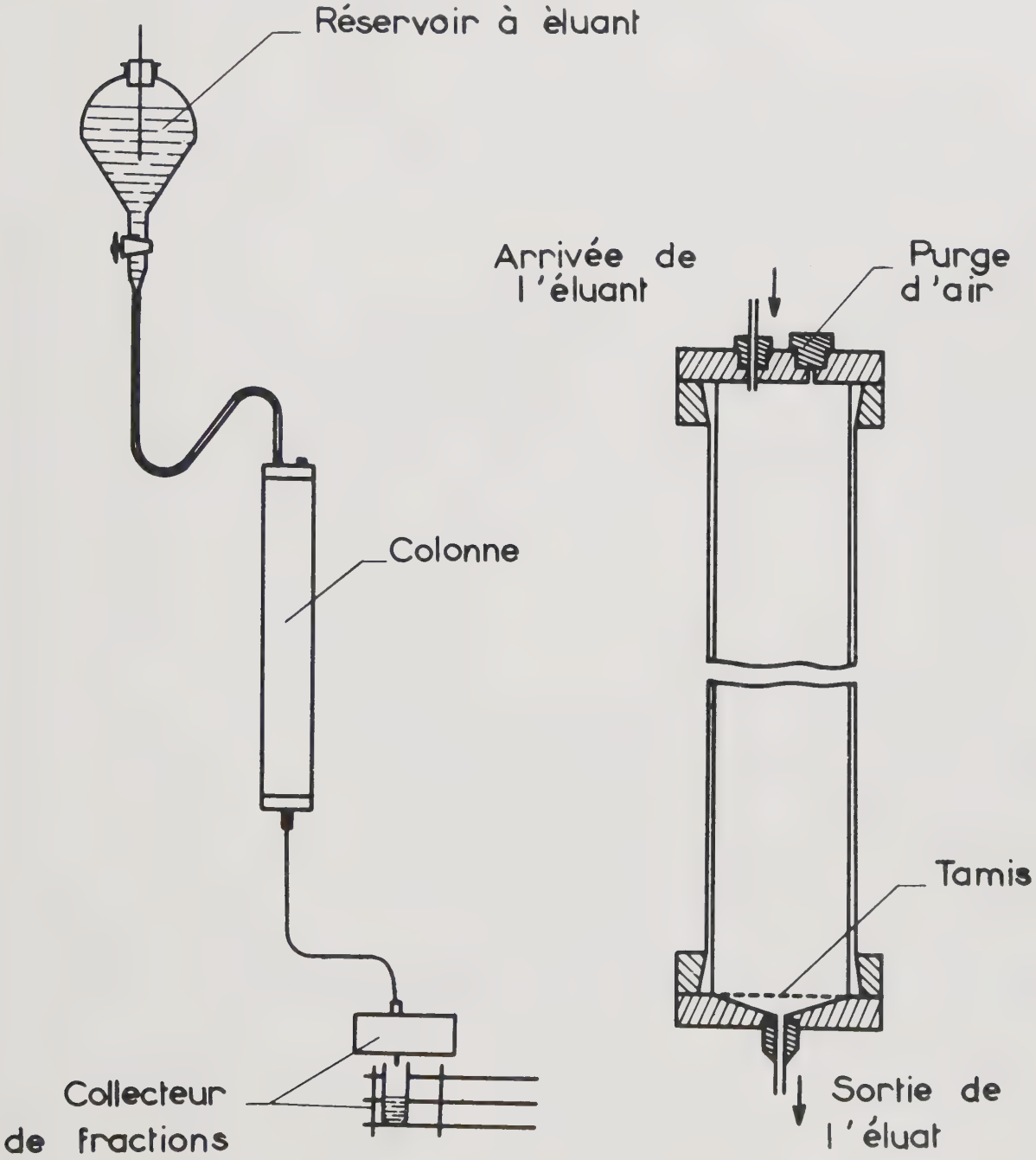



Schéma de l'appareillage

Colonne de séparation

Figure 4 - Appareil à chromatographie sur colonne.

1/ La colonne chromatographique (*) est un tube de verre long de 450 mm et ayant un diamètre de 25,4 mm. Sa partie supérieure possède une purge d'air et une tubulure pour l'arrivée de l'éluant. A la partie inférieure une autre tubulure permet de recueillir l'éluat ; le gel étant retenu dans la colonne par un tamis en nylon de 315 mesh supporté par une fine toile métallique.

2/ Un réservoir à robinet, équipé en vase de Mariotte, destiné à recevoir l'éluant, est relié à l'ajutage supérieur de la colonne. La pression du liquide est réglée en élevant plus ou moins le réservoir au-dessus de cette dernière.

3/ Le collecteur de fractions (**) permet de séparer l'éluat en quantité volumique plus ou moins importante, à l'aide d'un compteur de gouttes, dans des tubes à hémolyse.

Mise au point de la méthode

Nous avons recherché les conditions les plus favorables à une séparation de l'or colloïdal et des protéines sériques tout en respectant l'intégrité du colloïde et des liaisons éventuelles entre ce dernier et les protéines. Nous nous sommes préoccupés du choix de l'éluant et du gel.

Au cours de cette étude nous avons recherché des méthodes de dosage des protéines et de l'or 198.

a) *Choix de l'éluant*

Les éluants proposés pour séparer les protéines sériques en globulines et albumines au moyen du gel de séphadex sont le tampon tris : (tris hydroxyméthylaminométhane) 0,1 M ; HCl q. s. p. pH 8 ; NaCl 0,2 M (FLODIN, KILLANDER, 1962) ou d'autres tampons contenant des électrolytes. Si ces éluants respectent les protéines sériques on peut craindre qu'ils dénaturent les colloïdes d'or en surchargeant les particules d'ions supplémentaires (Chapitre I). Nous avons de ce fait adopté l'eau bidistillée comme éluant. Macroscopiquement les diverses dilutions au 1/1 000 des colloïdes $S_2$ et $S_6$ n'entraînent pas la floculation des particules, même au-delà d'une période de trois semaines, alors que la dilution au 1/100, 1/50, 1/25 et 1/10 laissent apparaître une légère floculation au bout de six jours pour l'eau distillée et le sérum physiologique ; les dilutions dans la gélatine à 3 % ne présentent pas de floculation, mais uniquement un trouble de la gélatine à partir du huitième jour.

b) *Dosage des protéines*

Parmi toutes les réactions susceptibles de détecter les protéines (liaisons peptidiques) la réaction du biuret est une des plus sensibles et elle se prête à une détermination quantitative facile.

Nous avons adopté la méthode de GORNALL (1949) pour doser les protéines ou la gélatine dans les liquides d'élution de la colonne.

Toutefois nous n'avons pas pu faire de mesure absolue de la concentration en protéines sériques car d'une part la gélatine et d'autre part l'or colloïdal ont un pouvoir d'extinction non négligeable aux longueurs d'ondes proposées pour le dosage par la méthode du biuret.

*Technique*

Le fractionnement de l'éluat se fait par volumes de 2,4 ml (62 gouttes) afin d'obtenir une quantité suffisante de liquide pour la mesure au spectrophotomètre.

On ajoute dans chaque tube à hémolyse contenant l'éluat 1 ml de réactif de GORNALL (Cu $SO_4$ pur cristallisé : 1, 50 g ; tartrate double de potassium et sodium : 6 g ; soude sans carbonate : 30 g ; iodure de potassium : 1 g ; eau distillée q. s. p. 1 litre), et laisse la coloration se développer à l'obscurité pendant 30 minutes. La concentration en protéines est appréciée au spectrophotomètre (***) à 538 mμ avec une cuve de 1 cm d'épaisseur.

*Expression des résultats*

Sur du papier millimétré on inscrit en abscisses chacune des fractions recueillies dans l'ordre

---

(*) Colonne calibrée QUICKFIT, du type K 25/45, délivrée par Pharmacia, Upsala, Suède - Jarre et Jacquin - Paris

(**) Collecteur de fractions LKB 3427 A compte-gouttes L. K. B. Stockholm - Suède.

(***) Spectrophotomètre électronique type "Maroc"
JOBIN et YVON - Arceuil, France

chronologique et en ordonnées la concentration en protéines leur correspondant en mg/ml ; la courbe obtenue en joignant les différents points ainsi déterminés rend compte par ses pics des fractions les plus riches en protéines.

c) *Dosage de la radioactivité*

La quantité d'or colloïdal contenue dans chaque tube est appréciée par mesure de la radioactivité dans une scintillateur à cristal creux.

On construit une courbe fonction du nombre de désintégrations par minute dans chaque éluat.

d) *Choix du gel*

Les gels de dextrane sont définis par leur degré de réticulation (G 25, G 100, G 200, etc...) qui est une fonction inverse de leur porosité. Celle-ci conditionne leur capacité de filtrer une molécule de poids moléculaire de plus en plus élevé.

C'est ainsi qu'avec le gel G 25, des composés dont le poids moléculaire est inférieur à 5 000 sont retenus, alors que les molécules plus lourdes ne le sont pas. Le gel G 200 pourra lui, assurer la rétention, transitoire, de molécules dont le poids moléculaire pourra atteindre 200 000.

Nous avons cherché une qualité de gel de dextrane susceptible de retenir les protéines sériques et incapable de capter les particules d'or. Le gel G 200 semble satisfaire à ces conditions, à l'encontre du gel G 25 qui ne sépare pas les protéines sériques des solutions colloïdales d'or. Les deux composés passent dans les mêmes fractions d'éluat et apparaissent dès le vingt et unième millilitre.

La séparation des protéines et de l'or est possible dans des conditions satisfaisantes avec le gel G 200. La figure 5, qui exprime la concentration de l'or colloïdal et des protéines dans les fractions successives, montre que le colloïde est décelé entre le 36 ème millilitre et le 60 ème millilitre, alors que les protéines ne sont éluées qu'à partir du 76 ème millilitre, en utilisant de l'eau distillée comme éluant.

Une séparation identique a été obtenue en utilisant d'une part de l'or colloïdal à particules de 30 mμ (Saclay $S_2$) et de 5 mμ (Saclay $S_6$) ainsi que l'or colloïdal polydispersé (Amersham G.C.S. 1P) et, d'autre part, les protéines sériques du Rat et du Lapin (Tableau VI).

Mode opératoire

a) *Remplissage de la colonne*

Dans la colonne fixée verticalement on introduit l'éluant sur une hauteur de dix centimètres, en prenant soin d'éliminer toutes les bulles d'air, puis on verse le gel de séphadex mis à gonfler au préalable dans vingt cinq parties d'éluant pendant 72 heures. Après dépôt du gel sur quelques centimètres d'épaisseur on laisse l'éluant s'écouler et ajoute peu à peu du séphadex jusqu'à obtention de la hauteur désirée, soit 24 centimètres dans nos expériences. La colonne est maintenue en fonctionnement durant six heures pour assurer une homogénéité dans le tassement du séphadex(*).

b) *Dépôt de l'échantillon*

L'élution est arrêtée. A l'aide d'une pipette l'échantillon est déposé en couche homogène sur la surface du gel recouverte de l'éluant.

La tête de la colonne, adaptée au réservoir d'éluant, est alors vissée. La colonne est remplie d'éluant et purgée d'air. L'élution est pratiquée à partir de cet instant avec un débit de 12 gouttes par minute durant 6 heures. L'éluat est recueilli dans des tubes à hémolyse à l'aide du collecteur de fraction par volumes de 2,4 ml (64 gouttes).

---

(*) Afin de réduire les variations de débit par suite de l'obstruction partielle de l'orifice d'écoulement (écrasement et colmatage du tamis de nylon placé à la base de la colonne) nous avons renforcé la résistance du tamis par une fine grille métallique et évité le colmatage de ses pores en le surmontant d'une fine couche de séphadex G 25.

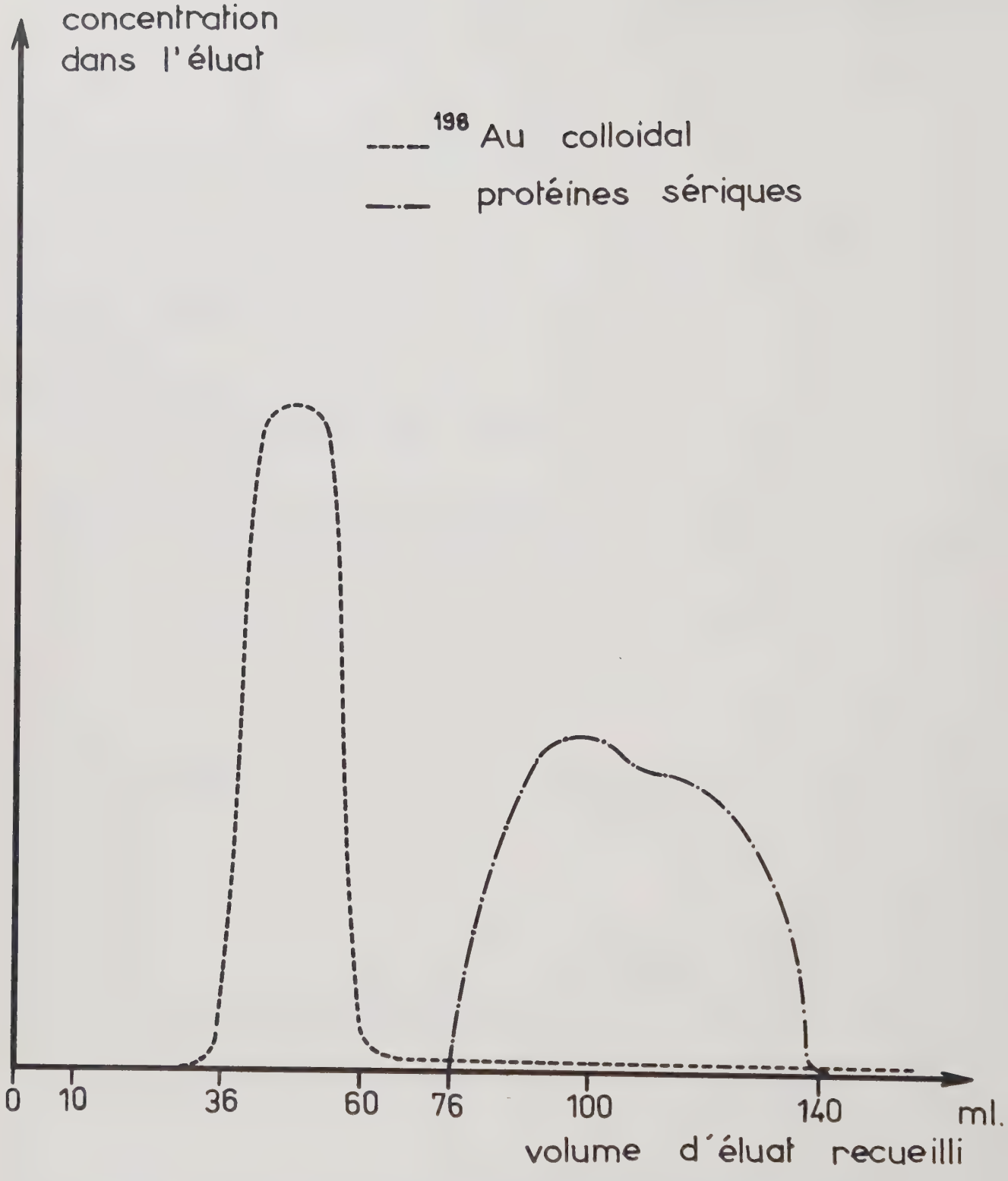



Figure 5 - Filtration sur gel de Séphadex G 200 de l'or colloïdal et des protéines sériques.

Tableau VI

Filtration de l'or colloïdal et des protéines sériques du rat et du lapin sur Séphadex G 200
(Les lignes horizontales représentent la fraction d'éluat contenant l'or colloïdal ou les protéines sériques)

| Substances déposée | n° | Quantité déposée (en µg) | Volume d'éluat collecté en ml : 30 40 50 60 70 80 90 100 |
|---|---|---|---|
| Or $S_2$ (particules de 30 mµ) | 1 | 350 | |
| | 2 | 44 | |
| | 3 | 44 | |
| | 4 | 44 | |
| | 5 | 350 | |
| | 6 | 17,5 | |
| | 7 | 35 | |
| Or $S_6$ (particules de 5 mµ) | 1 | 350 | |
| | 2 | 105 | |
| | 3 | 35 | |
| | 4 | 350 | |
| | 5 | 52,5 | |
| Or (polydispersé) | 1 | 200 | |
| | 2 | 2 500 | |
| | 3 | 200 | |
| Sérum de Rat (61 g/l de prot. totaux) | 1 | 12 200 | |
| | 2 | 9 150 | |
| Sérum Lapin (54 g/l de prot. totaux) | 1 | 10 800 | |
| | 2 | 8 100 | |

c) *Dosage de l'or 198 et des protéines*

La radioactivité de chaque tube et la concentration en protéines sont appréciées par les techniques que nous avons décrites ci-dessus. L'expression des résultats se fait graphiquement comme nous l'avons indiqué.

En résumé cette méthode qui permet de séparer facilement l'or colloïdal des protéines sera susceptible de prouver un transport si l'or, mis en contact avec le sérum, est retrouvé avec ce dernier au lieu de migrer avec une vitesse propre différente de celle des protéines sériques.

## B - COMPORTEMENT DES COLLOIDES D'OR VIS-A-VIS DE NOS TECHNIQUES D'ETUDES

Avant d'étudier le transport de l'or colloïdal par les protéines sériques nous avons analysé le comportement du colloïde d'or soumis aux méthodes que nous nous proposons d'employer.

### I - Migration électrophorétique de l'or colloïdal

Les particules d'or colloïdal enrobées de gélatine sont électronégatives (BONTOUX, 1961). Dans un champ électrique en présence d'un tampon de pH 8,6, elles migrent ainsi que les protéines vers l'anode.

Nous avons comparé par électrophorèse sur papier et sur cellogel la migration des colloïdes d'or, purs ou dilués dans diverses solutions, à celle des protéines sériques humaines.

1/ Electrophorèse sur papier

*- Technique*

Les solutions colloïdales ou leurs dilutions (1/10 à 1/1 000ème) dans l'eau, le soluté de chlorure de sodium à 9 ‰ ou l'eau gélatinée à 3 %, sont déposées à l'extrémité cathodique des bandes. La conduite de l'électrophorèse et la préparation des autoradiographies sont effectuées selon la technique que nous avons décrite ci-dessus.

Dans certains cas la gélatine(*) destinée à la préparation de l'or colloïdal a été mise en évidence par le noir amido, mais en utilisant un bain décolorant anhydre (méthanol : 9 ; acide acétique : 1/ (GRASSMAN, HANNIG et KNEDEL, 1951) qui ne dissout pas la gélatine au contraire du mélange hydraté utilisé de manière habituelle.

*- Résultats*

Les diverses solutions colloïdales migrent avec une traînée importante qui s'étale depuis le dépôt ; toutefois le front de migration est différent selon l'origine de l'or. Par comparaison avec l'électrophorégramme d'un sérum humain on constate que l'or colloïdal $S_2$ (particules de 30 mμ) ne dépasse pas le niveau des $\alpha_2$ globulines ; par contre l'or colloïdal $S_6$ (particules de 5 mμ) et l'or Amersham "polydispersé" atteignent les $\alpha_1$ globulines (fig. 6).

La gélatine stérilisée migre entre les γ et β globulines ; au contraire lorsque ce protecteur est incorporé au colloïde, il suit le sort des particules colloïdales et se concentre surtout au front de migration de ces dernières (fig. 7).

Une dilution des préparations colloïdales d'or supérieure au 1/50 dans l'eau ou le soluté de chlorure de sodium à 9 ‰ conduit au bout de quelques heures à la dégradation des particules d'or puisqu'elles perdent leur mobilité électrophorétique. Des dilutions identiques dans les solutions gélatinées à 3 % gardent intacts les caractères de migration. Si la proportion d'or et de gélatine est dans un rapport convenable, la gélatine migre au niveau de l'or colloïdal. Si la quantité de gélatine est très importante par rapport à la quantité d'or, le colloïde est retenu par les molécules de gélatine et reste au niveau de ces dernières c'est-à-dire entre les β et γ globulines.

2/ Electrophorèse sur cellogel

*- Technique*

On ensemence du côté cathodique 2 μl d'or colloïdal ou de sa dilution, comprise entre 1/10 et 1/100, dans de l'eau, du soluté de chlorure de sodium à 9 pour mille ou une solution de gélatine à 3 pour cent. Un dépôt de sérum humain sur une bande témoin permettra de localiser la migration des particules.

*- Résultats*

La trainée laissée par les colloïdes sur le support de papier n'est pas retrouvée sur le cellogel ; la migration du dépôt est totale en un front bien défini.

La mobilité des trois colloïdes comparée à celle des protéines sériques montre, comme pour le papier, que l'or $S_2$ migre assez lentement et n'atteint que les $\alpha_2$ globulines ; par contre les colloïdes $S_6$ et Amersham se déplacent plus vite et sont retrouvés au niveau des $\alpha_1$ globulines (fig. 8).

La gélatine, destinée à la préparation de l'or, est identifiée entre les β et γ globulines humaines. Lorsqu'elle est constituant du colloïde (à raison de 30 mg par ml pour les solutions $S_2$ et $S_6$ et de 35 mg par ml pour les solutions Amersham) elle suit le sort de ce dernier et se situe au même endroit que les particules.

Cependant ces dernières, diluées dans des solutions gélatineuses (dilution de l'or comprise entre 1/10 et 1/1 000) ne montrent plus la même mobilité électrophorétique ; leur migration s'effectue avec une trainée dont le front ne dépasse pas celui de la gélatine.

Une dilution extemporanée du colloïde d'or dans l'eau ou le soluté de chlorure de sodium à

---

(*) La gélatine utilisée pour la fabrication des colloïdes $S_2$ et $S_6$ à Saclay et polydispersé à Amersham est stérilisée au préalable. Cette stérilisation (2 kg/cm² pendant 30 minutes) entraîne une hydrolyse partielle de la gélatine et par suite une certaine fluidité à la température ambiante. Nos études porteront sur cette gélatine modifiée.

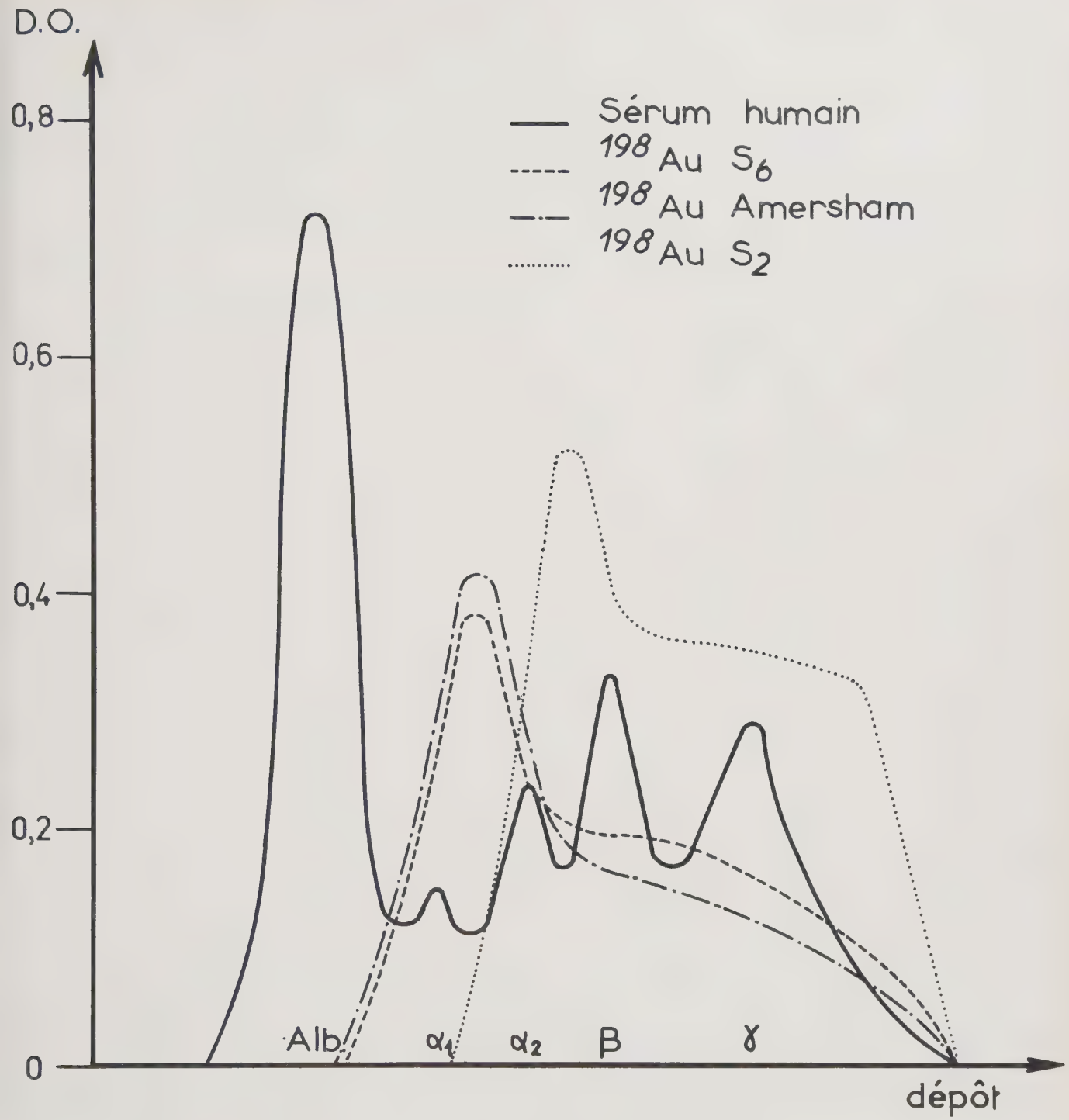



Figure 6 - Migration électrophorétique sur papier des divers colloïdes d'or ; comparaison avec la migration des protéines sériques humaines (en trait plein, densité optique des protéines - en tirés, densité optique des autoradiographies).

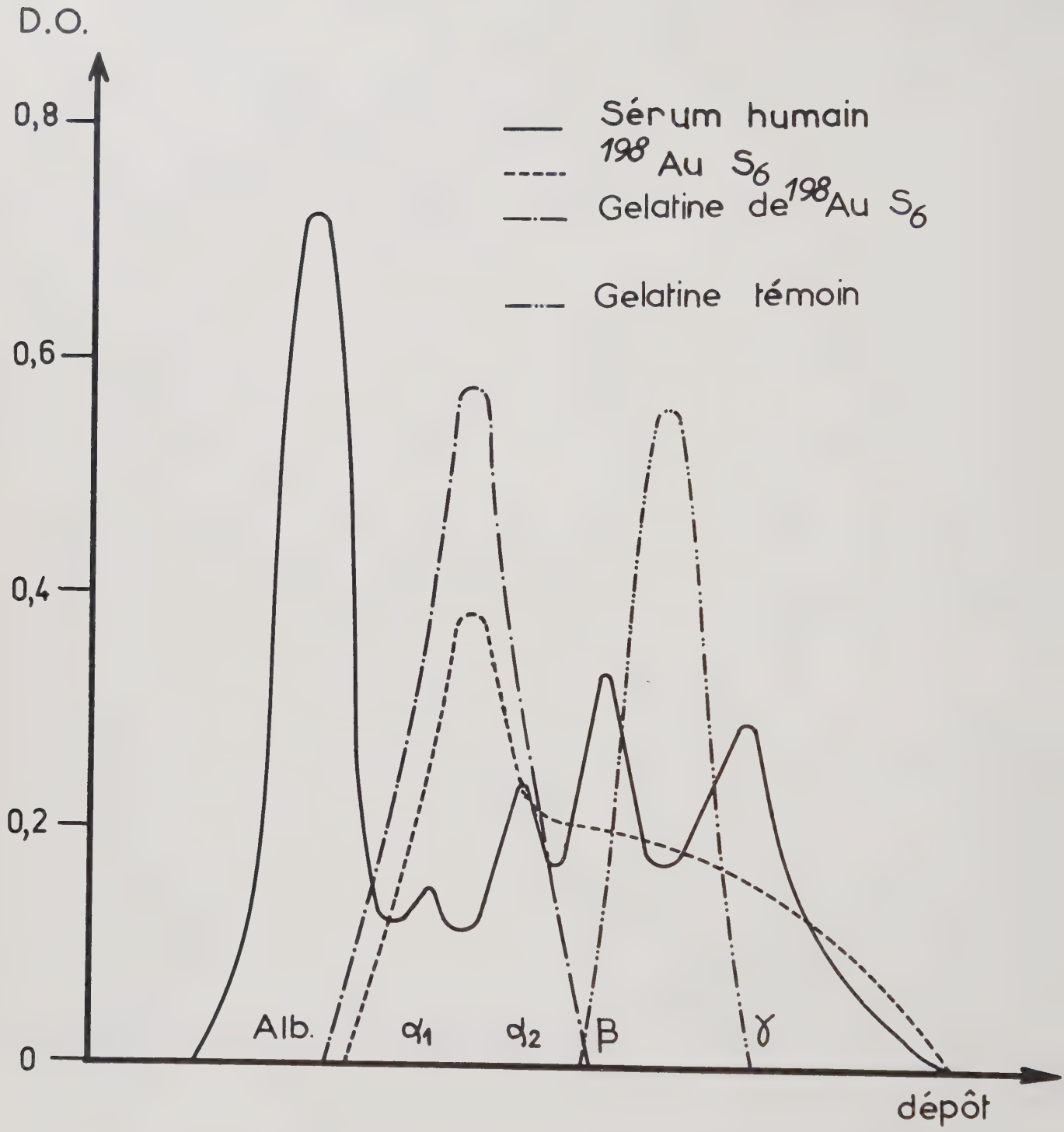



Figure 7 - Comparaison des mobilités électrophorétiques sur papier de la gélatine seule et de la gélatine contenue dans la solution colloïdale $S_6$ par rapport à l'électrophorégramme d'un sérum humain.

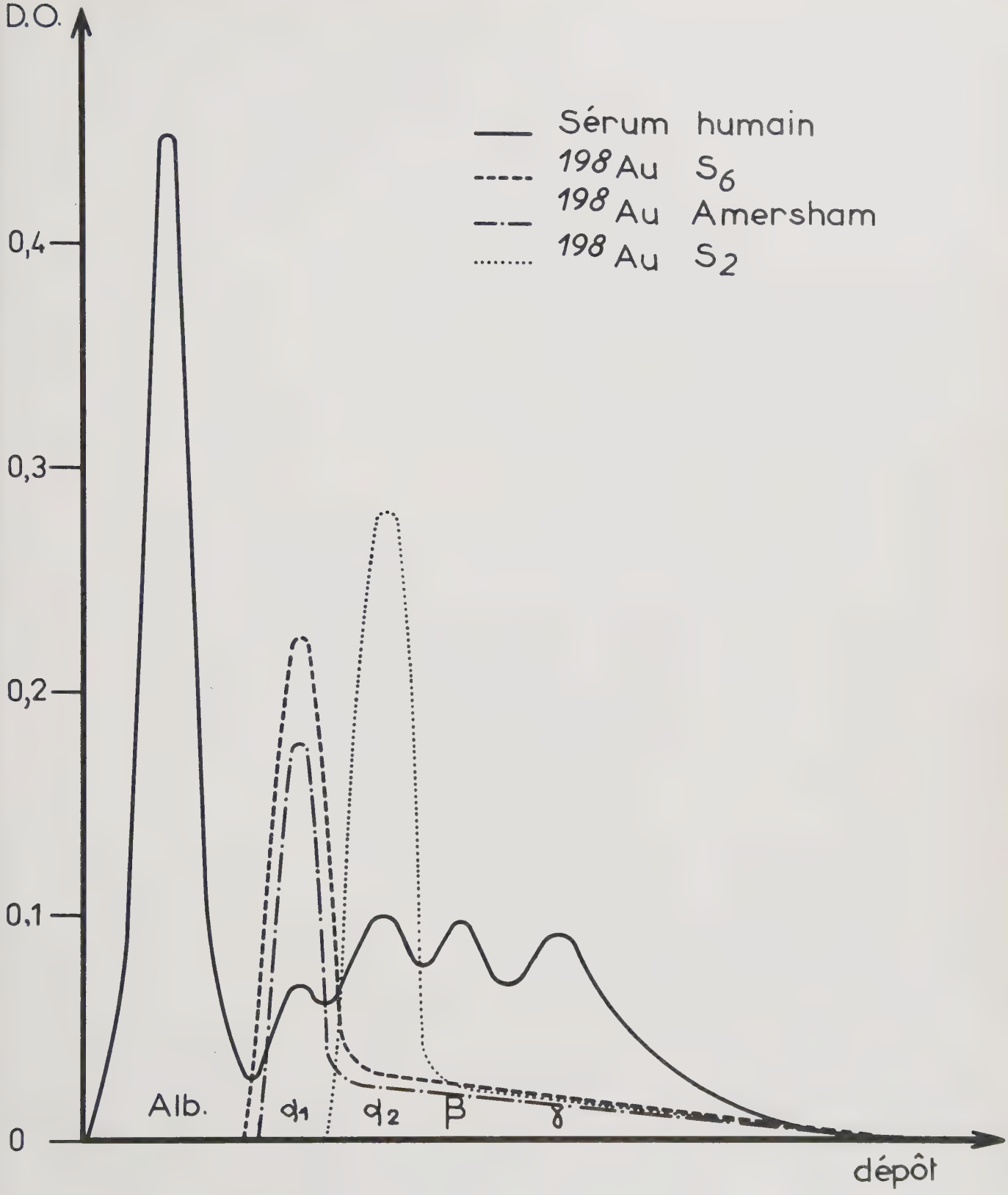



Figure 8 - Migration électrophorétique sur cellogel des divers colloïdes d'or ; comparaison avec la migration des protéines sériques humaines.

9 ‰, inférieure au centième, ne laisse pas apparaitre, après électrophorèse, de dénaturation puisque le colloïde garde sa mobilité.

Ces phénomènes constatés lors des dilutions dans l'eau, le soluté de chlorure de sodium à 9 ‰ ou les solutions gélatinées à 3 % sont identiques quel que soit le colloïde d'or envisagé. A titre d'exemple nous explicitons par le Tableau VII l'effet des dilutions sur l'or colloïdal $S_2$ constaté par électrophorèse tant sur papier que sur cellogel.

Tableau VII

Mobilité électrophorétique - I - sur papier - II - sur cellogel, du colloïde $S_2$ après dilution

| Sérum humain | Globulines | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dépôt | γ | β | $\alpha_2$ | $\alpha_1$, | Albumine |
| I a) $^{198}Au$ $S_2$ sans dilution | | + | + | + + + | | |
| b) Dilution dans l'eau ou le soluté de NaCl à 9 ‰ | | | | | | |
| - faible (< 1/100) | | + | + | + + + | | |
| - forte (> 1/100) | + + + | | | | | |
| c) Dilution dans gélatine à 3 % | | | | | | |
| - faible (< 1/10) | | + | + | + + + | | |
| - forte (> 1/10) | | + + + | | | | |
| II a) $^{198}Au$ $S_2$ sans dilution | | | | + + + | | |
| b) Dilution dans l'eau ou le soluté de NaCl à 9 ‰ | | | | | | |
| - faible (< 1/100) | | | | + + + | | |
| - forte (> 1/100) | + + + | | | | | |
| c) Dilution dans gélatine à 3 % | | | | | | |
| - faible (< 1/10) | | + | + | + + | | |
| - forte (> 1/10) | | + + + + | | | | |

II - Elution de l'or colloïdal dans le sephadex G 200

Nous avons vu au cours de la description de la méthode que l'or colloïdal, quelle que soit son origine, était retrouvé dans les conditions décrites entre le 36ème et le 60ème millilitre d'éluat.

La présence d'une fraction colorée en jaune au cours de l'élution des colloïdes $S_6$ et Amersham nous a conduit à rechercher la cause et la nature de cette coloration. Dans ce but nous avons identifié les autres constituants des préparations colloïdales c'est-à-dire le glucose, la gélatine et leurs éventuels produits de dégradation.

*- Technique*

La recherche de la gélatine a été menée différemment selon l'origine du colloïde. En effet, si le réactif de Gornall convient pour l'or $S_2$, qui ne laisse pas apparaître de zone jaunâtre après le passage de l'or radioactif, il se révèle inutilisable pour les solutions $S_6$ et Amersham qui sont réductrices des ions cuivriques en milieu alcalin. Pour ces dernières préparations la gélatine est identifiée par le noir Amido. Des gouttes d'éluat correspondant à chacune des fractions sont déposées sur des disques de papier filtre puis colorées au noir Amido après dessication. Le glucose est caractérisé d'une part en mettant en évidence ses propriétés réductrices vis-à-vis de la liqueur de Fehling et d'autre part à l'aide de papier réactif à la glucose-oxydase (clinistix).

- *Résultats*

Au cours de l'élution du colloïde $S_2$ il est possible d'identifier la gélatine à partir du 90ème millilitre d'éluat.

L'élution de l'or $S_6$ et Amersham montre pour cette même fraction des liquides colorés en jaune où nous avons pu identifier non seulement la gélatine mais aussi une quantité importante de composés réducteurs correspondant au glucose et à ses produits de dégradation.

Notons que cette fraction gélatineuse est inactive et en quantité si minime qu'elle n'entraînera qu'une faible erreur par excès lors de la mise en évidence des protéines après filtration des mélanges sérum-or colloïdal 198.

## C - DISCUSSION

Ces différents résultats nous permettent d'éclaircir trois points dont nous aurons à tenir compte ultérieurement et qui concernent la taille des particules, la stabilité des colloides soumis à divers traitements, et la liaison gélatine-particules d'or.

Les colloïdes ne peuvent pas être séparés, en fonction de leur taille, sur gel de sephadex. La méthode électrophorétique montre par contre que les particules de 30 mμ ($S_2$) migrent moins vite que les particules de 5 mμ ($S_6$) ou de taille variée (préparation d'Amersham 5 à 15 mμ environ) (fig. 9). Ce phénomène peut s'expliquer conjointement par la différence de masse et du nombre de charges des particules.

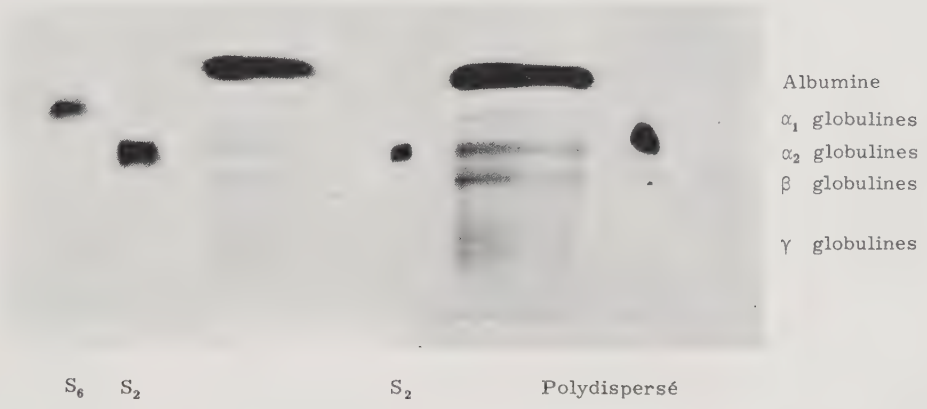



Figure 9 - Migration électrophorétique des colloïdes d'or en fonction de la taille de leurs particules (témoin : sérum humain).

Si l'on considère que la masse intervient dans la migration, en dehors de la masse propre du noyau d'or, il faut aussi tenir compte de celle de la gélatine protectrice. Selon BONTOUX (1965) cette enveloppe gélatineuse doublerait la taille de la particule stabilisée. Ainsi un grain d'or de 30 mμ mesuré au microscope électronique serait en réalité une particule or-gélatine de 60 mμ de diamètre. MARIGNAN (1965) considère que ni la masse ni d'ailleurs la charge propre du grain d'or n'interviennent ; dans le cas de l'or gélatiné la migration serait imposée uniquement par le stabilisant. Les charges de celui-ci sont dues aux acides aminés (POURADIER, 1965) dont trois types de fonctions peuvent se rencontrer libres dans les molécules de gélatine qui sont des macromolécules linéaires : les fonctions alcools, les fonctions carboxyles et les fonctions azotées basiques. A côté des acides aminés, LANDUCI, POURADIER et DURANTE (1958) signalent des restes uroniques et des fonctions aldéhydes.

A partir de ces données, la mobilité différente des divers colloïdes peut être expliquée en admettant qu'à poids égal d'or les petites particules renferment par rapport aux grosses davantage de charges, c'est-à-dire davantage de gélatine répartie à leur surface.

Ceci s'explique facilement car dans ces conditions, si l'on admet que l'épaisseur de la couche de gélatine est identique sur les petites et les grosses particules, le rapport de la surface au volume des particules décroît avec l'augmentation de leur dimensions.

$$R = \frac{\text{surface}}{\text{volume}} = \frac{4\pi R_2}{4/3\ \pi R_3}$$

La stabilité des colloïdes semble modifiée selon les techniques opératoires : d'une part la migration sur papier entraîne l'apparition de trainées importantes attribuables soit à une adsorption des particules sur le support, soit à une altération du colloïde (cette modification des solutions colloïdales n'est pas retrouvée par les deux autres méthodes) ; d'autre part, les particules semblent dénaturées par une forte dilution dans l'eau ou les solutions d'électrolyte puisqu'elles perdent leur mobilité, sans doute par suite de la solubilisation du protecteur qui entraîne une perte des charges. Toutefois ces grains colloïdaux apparemment dénaturés par dilution retrouvent leur pouvoir de migration lorsqu'on leur ajoute divers protecteurs, porteurs de charges, tels que de la sérum-albumine à 40 ‰, du sérum sanguin ou de la solution gélatinée à 3 %. Cette hypothèse et ces faits concordent avec la thèse de MARIGNAN qui attribue la vitesse de migration des particules d'or colloïdal aux seules charges du protecteur.

BONTOUX (1961) interprète l'interaction de la gélatine et du chlorure d'or, constatée lors de ces études, par la formation d'un complexe entre les $NH_2$ de la gélatine vraisemblablement oxydés en imines et l'or à l'état aureux. Dans nos expériences les modalités de migration de la gélatine et des particules sont variables selon la méthode envisagée :

1/ Par électrophorèse, d'une part la gélatine contenue dans le colloïde migre à la même vitesse que les particules alors qu'elle se déplace moins vite lorsqu'elle est seule ; d'autre part un excès de gélatine ajouté à la solution colloïdale retarde la migration de l'or au niveau de celle-ci.

2/ Sur sephadex, par contre, une proportion de la gélatine, détachée des particules, est retrouvée après la filtration de l'or. Il nous est impossible de préciser s'il s'agit d'un excès de gélatine, qui serait à l'état libre en ce cas (BIOZZI, 1965), ou si cette dernière est détachée des particules par le procédé opératoire qui entraîne une forte dilution. En effet, on ne peut caractériser la gélatine dans les fractions d'or fortement colorées dont le pouvoir d'absorption est voisin de celui de la coloration donnée au biuret par la gélatine.

## D - CONCLUSION

La méthode de sédimentation-autoradiographie du sang incubé avec les colloïdes radioactifs justifiera, si elle revèle une radioactivité au niveau du plasma, les études concernant le transport des colloïdes d'or 198 par les protéines sériques. A cette fin nous utiliserons les techniques d'électrophorèse sur support et de filtration exclusion sur gel de sephadex. Cette dernière, à l'encontre de la précédente, ne met pas en jeu des forces susceptibles de détériorer les liaisons éventuelles or colloïdal-protéines. De plus, les vitesses de filtration des témoins d'or colloïdal 198 et de protéines sériques étant différentes, un passage identique des deux éléments après leur mélange laissera supposer à leur liaison.

Les méthodes utilisées à propos des diverses solutions colloïdales nous ont permis de montrer que les particules d'or possédaient par électrophorèse une mobilité fonction de leur taille. Une telle relation n'a pas été retrouvée sur gel de sephadex.

De plus, l'électrophorèse met en évidence une interaction entre la gélatine et l'or puisque ce dernier entraîne les molécules gélatineuses lorsqu'elles sont peu abondantes et inversement il est retenu lorsqu'elles sont prépondérantes.

De toutes façons ces méthodes sont imporfaites, elles nécessiteront une grande prudence dans l'interprétation des résultats.

CHAPITRE V

# RÉPARTITION DE L'OR COLLOIDAL DANS LE PLASMA ET LES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG

Les fractions sanguines qui peuvent participer au transport de l'or colloïdal sont les hématies, les leucocytes et éléments histiocytaires, et le plasma. La répartition de la radioactivité dans ces éléments a été précisée en pratiquant des autoradiographies de coupes de culots de sang centrifugé et congelé après incubation avec de l'or colloïdal.

## A - TECHNIQUE

Des expériences *in vitro* ont été effectuées sur du sang hépariné de Lapin et de Rat. Dans les essais *in vivo* les rats reçoivent l'or colloïdal par voie intraveineuse après anesthésie par injection intrapéritonéale de Pentobarbital sodique (Nembutal vétérinaire) à la dose de 40 mg/kg d'animal.

### 1 - Essais "*in vitro*"

5 ml de sang sont prélevés sur héparine dans la veine marginale de l'oreille chez le Lapin (10 animaux), par ponction cadiaque chez le Rat (4 animaux).

Le sang est mis à incuber à 37° pendant 45 minutes avec l'or colloïdal ($S_2$, $S_6$ ou Amersham) ajouté à des doses qui exprimées en or sont comprises entre 1 et 710 µg par millilitre. L'activité spécifique du colloïde varie entre 0,02 µCi et 4,55 µCi par microgramme d'or.

Après ce délai le mélange est centrifugé, congelé et les autoradiographies des coupes du culot sont préparées ainsi que nous l'avons indiqué (Chapitre IV).

### 2 - Essais "*in vivo*"

On injecte dans la veine du penis du Rat les solutions colloïdales $S_2$, $S_6$ ou Amersham ayant des activités spécifiques comprises entre 0,02 µCi et 4,55 µCi par gamma d'or à raison de 100 à 625 gamma d'or par 100 grammes de poids corporel (trois animaux par colloïde).

Au moment du prélèvement l'animal est hépariné (5 000 U. I. /kg) pour éviter toute coagulation.

La centrifugation, la congélation, la réalisation des coupes et leurs autoradiographies sont conduites comme précédemment.

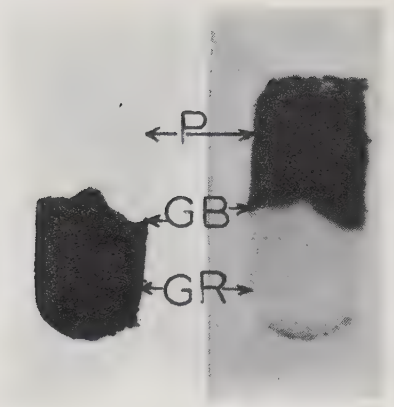
## B - RESULTATS

La répartition de l'or colloïdal 198 incubé *in vitro* dans le sang est hétérogène et ceci quel que soit le colloïde d'or utilisé. Les images obtenues à partir des blocs congelés (fig. 10) montrent que la concentration radioactive est négligeable dans les hématies, importante dans les leucocytes et le plasma comme l'indiquent les résultats des mesures densitométriques effectuées sur les autoradiographies avec un densitomètre(*) à source punctiforme (Tableau VIII).

Si on exprime par 100 la concentration radioactive dans le plasma de Lapin nous constatons que le taux d'or colloïdal dans les leucocytes est compris entre 131 et 185, par contre dans les hématies la radioactivité est représentée par des valeurs situées entre 5 et 9.

---

(*) Densitomètre MK 4B BALDWIN relié à un photomètre MND. MKS BALDWIN




A B

Figure 10 - A - Coupe d'un culot globulaire de sang de Lapin mis à incuber *in vitro* avec du colloïde $S_6$
B - Autoradiographie correspondante
(P : Plasma - GB : globules blancs - GR : globules rouges)

Dans le sang du Rat la répartition n'est pas sensiblement différente. La concentration de l'or dans les hématies et les leucocytes est respectivement de 15 et 144.

Enfin, il ne semble pas y avoir une différence nette dans la répartition du colloïde selon son origine.

Tableau VIII

Répartition "*in vitro*" de l'or colloïdal dans le plasma et les éléments figurés du sang
(Comparativement à la concentration du plasma prise égale à 100)

| Animal | Nature de l'or | Dose en µg d'or par ml de sang | Nombre d'animaux | Concentration radioactive | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Plasma | Hématies | Leucocytes |
| Lapin | $S_2$ | 1 | 1 | 100 | 11 | 113 |
| | | 12,5 | 3 | 100 | 9 | 131 |
| | $S_6$ | 1 | 3 | 100 | 5 | 185 |
| | Amersham | 710 | 3 | 100 | 6 | 178 |
| Rat | $S_2$ | 100 | 3 | 100 | 15 | 144 |
| | | 175 | 1 | 100 | 15 | 144 |

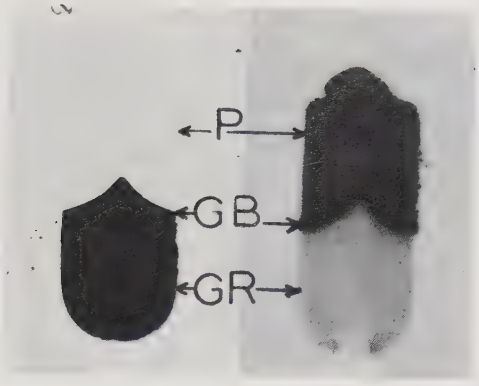
*In vivo* la répartition du colloïde dans les fractions sanguines est variable selon la nature de l'or et le temps de prélèvement. Pour $S_2$, trois minutes après l'injection, les résultats ne diffèrent pas de ceux obtenus *in vitro* (fig. 11).

La concentration dans les leucocytes est plus élevée que dans le plasma. Les hématies contiennent une radioactivtié faible. Pour $S_6$ (fig. 12) dès la 3ème minute le colloïde a quitté le plasma. L'or circulant est concentré dans les leucocytes. Après 25 minutes un résultat identique est observé.

C - DISCUSSION

Le transport de l'or colloïdal semble assuré par le plasma. Toutefois les particules sont rapidement phagocytées par les leucocytes ainsi que l'atteste la concentration radioactive dans ces derniers.

Ces résultats confirment les mesures quantitatives effectuées "*in vitro*" par MAUPIN et LOVERDO (1958) sur du sang humain. Ces auteurs ont montré que ce marquage des leucocytes par




A B

Figure 11 - A - Coupe d'un culot globulaire de sang prélevé chez le Rat 3 minutes après injection du colloïde $S_2$.
B - Autoradiographie correspondante
(P : Plasma - GB : globules blancs - GR : globules rouges)

A B A B

(1) (2)

Figure 12 - A - Coupe d'un culot globulaire de sang prélevé chez le Rat (1) 3 minutes et (2) 25 minutes après injection de colloïde $S_8$
B - Autoradiographie correspondante
(P : plasma - GB : globules blancs - GR : globules rouges)

l'or colloïdal était supérieur à celui conféré par le radiochromate ou le radiophosphate dans les mêmes conditions d'expériences.

L'intensité de disparition des particules d'or du plasma est plus intense *in vivo* que *in vitro* ; il s'y ajoute une capture du colloïde par les cellules de Küpffer qui provoque une épuration intense du colloïde dans le sang et dont la vitesse est donnée par la période biologique.

L'or colloïdal à petites particules semble soumis à une colloidopexie plus rapide que ne l'est le $S_2$ puisqu'il disparait du plasma dès la 3ème minute. Ces faits prouvent que la période biologique dans le plasma est inférieure à celle calculée pour le sang total.

L'importance du plasma n'est pas négligeable dans les premières minutes qui suivent l'injection, mais elle semble diminuer au fur et à mesure de la capture des particules par les leucocytes et éléments du S. R. E.

## D - CONCLUSION

Cette étude montre l'importance du plasma qui assure l'arrivée du colloïde au contact des éléments phagocytaires. La phagocytose étant moins prononcée *in vitro* que *in vivo* nous avons poursuivi nos recherches, justifiées par ces résultats, surtout par des expériences *in vitro* que nous complèterons par des essais *in vivo* avec des temps d'incubation très brefs.

CHAPITRE VI

# ÉTUDE DE LA LIAISON *IN VITRO* DES PARTICULES COLLOIDALES D'OR 198 AVEC LES PROTÉINES SÉRIQUES DE SUJETS SAINS

L'étude de la répartition de l'or dans les fractions sanguines nous a montré qu'après incubation *in vitro* une forte proportion des particules radioactives était retrouvée au niveau du plasma. Nous nous proposons maintenant de rechercher une fixation éventuelle de l'or sur les diverses protéïnes sériques en appliquant les méthodes de séparation que nous avons décrites (Chapitre IV).

- Principe

De l'or colloïdal en proportion variable est mis en contact avec du sérum sanguin de divers animaux dans des conditions précises. Le mélange est fractionné, dans le but de mettre en évidence le comportement de l'or colloïdal vis-à-vis des protéïnes sériques, par électrophorèse et chromatographie.

## I - ELECTROPHORESE

Les essais sont effectués :

1/ avec des doses d'or variables ; en effet on peut espérer montrer une fixation différente du colloïde selon les quantités ajoutées,

2/ avec le sérum de plusieurs espèces animales (Homme, Rat, Lapin, Cobaye) dont les mêmes fractions ont des mobilités différentes. On peut se demander si la fixation de l'or dans ces conditions sera modifiée,

3/ avec deux tampons, pour les études sur cellogel, dans le but de voir une variation de la migration de l'un des deux constituants du mélange.

- Technique

Le sang est obtenu chez des sujets sains. Il est prélevé à la veine du pli du coude chez l'Homme(*), dans la veine marginale de l'oreille chez le Lapin, et par ponction cardiaque chez le Rat et le Cobaye. Ces deux derniers animaux sont anesthésiés au Pentobarbital sodique (nembutal vétérinaire) par injection intraparitonéale, à la dose de 40 mg/kg d'animal. Après coagulation, les échantillons sont centrifugés afin de recueillir le sérum. Sur chacun d'eux les protides totaux sont dosés par la réaction du biuret suivant la méthode de GORNALL, BARDOWILL et coll. (1949). La courbe reliant la densité optique à la teneur en protides est étalonnée à partir d'un sérum dont les protides sont dosés par gravimétrie après précipitation par le mélange alcool-éther à chaud.

Le sérum est alors mélangé à des quantités croissantes d'or colloïdal $^{198}Au$. Le Tableau IX récapitule l'ensemble des expériences. En regard des espèces animales nous indiquons les colloïdes utilisés, le nombre d'expériences effectuées dans chaque cas et le poids d'or ajouté par gramme de protéïnes pour lequel nous précisons le nombre de doses et les quantités extrêmes utilisées.

Les mélanges sont mis à incuber à 37°C pendant 45 minutes avec agitation mécanique. Après ce délai les solutions sont déposées sur le côté cathodique des bandes placées dans une cuve à électrophorèse. Le volume est tel que la quantité de protéïnes mise en oeuvre est d'environ 500 gamma sur le support de papier et de 100 gamma sur celui de cellogel.

---

(*) Nous remercions vivement Monsieur HUGO et le personnel du Laboratoire d'Analyses Médicales de Saclay pour l'obtention de ces échantillons biologiques.

Tableau IX

Conditions experimentales pour la réalisation du mélange "*in vitro*" de l'or Colloïdal avec les protéines sériques de diverses espèces animales saines

| Espèces | Nature de l'or | Nombre d'expériences | Nombre de doses | Poids d'or en mg ajouté par gramme de protéines | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Minimum | Maximum |
| Homme | Saclay $S_2$ | 30 | 11 | 0,010 | 43 |
| | Saclay $S_6$ | 30 | 6 | 0,005 | 43 |
| | Amersham | 20 | 4 | 0,100 | 13 |
| Lapin | Saclay $S_2$ | 10 | 5 | 0,161 | 6,500 |
| | Saclay $S_6$ | 10 | 3 | 0,007 | 0,7 |
| | Amersham | 10 | 3 | 0,100 | 10 |
| Rat | Saclay $S_2$ | 5 | 4 | 0,01 | 10 |
| | Saclay $S_6$ | 5 | 4 | 0,01 | 10 |
| | Amersham | 5 | 4 | | |
| Cobaye | Saclay $S_2$ | 3 | 3 | 0,1 | 10 |
| | Saclay $S_6$ | 3 | 3 | 0,1 | 10 |
| | Amersham | 3 | 3 | 0,1 | 10 |

Pour permettre une comparaison facile, un témoin d'or colloïdal est mis à migrer dans les mêmes conditions que le mélange. Les autoradiographies des électrophorégrammes sont préparées comme nous l'avons indiqué. L'enregistrement de la densité optique de l'autoradiographie est superposé à celui de l'électrophorèse. Le pourcentage de radioactivité correspondant à chaque fraction protéique est calculé par planimétrie.

- Résultats

Quelle que soit la dose d'or en contact avec les protéines on constate sur papier et sur cellogel que la localisation des particules colloïdales d'or 198 est toujours identique par rapport aux fractions protéiniques.

La préparation $S_2$ migre au niveau des $\alpha_2$ globulines (fig. 13), les préparations $S_6$ et Amersham au niveau des $\alpha_1$ globulines (fig. 14). Toutefois les autoradiographies des bandes de papier montrent que les caractères de migration de l'or colloïdal seul ne correspondent pas exactement à ceux du colloïde mélangé à des protéines. En effet, si le front de migration est semblable dans les deux cas, la traînée que nous avons observée avec l'or seul est beaucoup moins importante lorsque le colloïde est en présence des protéines. La figure 15 représente un exemple des résultats obtenus avec l'or colloïdal $S_2$.

L'emploi du cellogel ne montre pas cette différence. Le comportement de l'or témoin est identique à celui de l'or mélangé aux protéines (fig. 16) avec les deux tampons utilisés. La radioactivité est retrouvée au niveau des $\alpha_1$ globulines pour les colloïdes $S_6$ et Amersham et au niveau des $\alpha_2$ globulines pour le colloïde $S_2$.

Le Tableau X indique les pourcentages de radioactivité retrouvés dans les fractions protéiniques du sérum humain avec l'or $S_2$ et $S_6$.

Sur support de papier, avec le colloïde $S_2$, on retrouve au niveau des alpha 2-béta globulines 62 % de la radioactivité. Le reste de cette dernière s'étale le long des gamma-globulines. Sur support de cellogel 86 % des particules d'or se concentrent au même point que les alpha 2 globulines et 14 % à celui des béta globulines. La fraction gamma globulines ne présente pas de radioactivité.

Dans le cas des colloïdes à petites particules ($S_6$ et Amersham) on retrouve sur papier 78 % de la radioactivité au niveau des alpha globulines, 12 % à celui des béta globulines et 11 % à celui des gamma globulines. Par contre sur cellogel la répartition est de 85 % et 15 % respectivement au niveau des alpha 1 et alpha 2 globulines. Les béta et gamma globulines sont dépourvues de radioactivité.

Si les électrophorégrammes des protéines sériques diffèrent quelque peu selon l'espèce animale en particulier en ce qui concerne le front de migration des albumines, les variations de mo-

bilité des fractions $\alpha_1$ et $\alpha_2$, qui nous intéressent ici, sont négligeables et ne permettent pas de savoir si l'or colloïdal subit le sort de l'une ou l'autre fraction, ce qui permettrait de conclure à une fixation.

Les deux tampons utilisés avec le support de cellogel, n'ont pas permis de mettre en évidence une mobilité différente de l'un des constituants du mélange. Les petites particules ($S_6$ et Amersham) se situent toujours au niveau des $\alpha_1$ globulines, les grosses particules ($S_2$) au niveau des $\alpha_2$ globulines.

Notons enfin que les autoradiographies nous montrent, après un temps de contact prolongé, un ncircissement au niveau des albumines. Cette radioactivité est minime (0,5 %) ; elle est retrouvée avec les trois colloïdes étudiés.

Cette part radioactive semble provenir de l'or ionique contenu dans chacune des préparations étudiées qui est, comme on le sait (Chapitre I), inférieure à 2 % pour les colloïdes francais ($S_2$ et $S_6$) et à 0,01 % pour le colloïde anglais (G. C. S. 1P).

Nous reviendrons ultérieurement sur l'étude de cet or ionique par le mélange d'une solution de chlorure d'or (198) au sérum humain afin de préciser son lieu de fixation sur les protéines.

Tableau X

Repartition de l'or colloïdal dans les protéines du sérum humain normal
(Moyenne de 5 expériences dans chaque cas)

| Nature de l'or | Support | Albumine | Globulines | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| Saclay $S_2$ | Papier | 0 | | 62 | | 38 |
| | Cellogel | 0 | | 86 | 14 | 0 |
| Saclay $S_6$ | Papier | 0 | 78 | | 12 | 0 |
| | Cellogel | 0 | 85 | 15 | 0 | 0 |

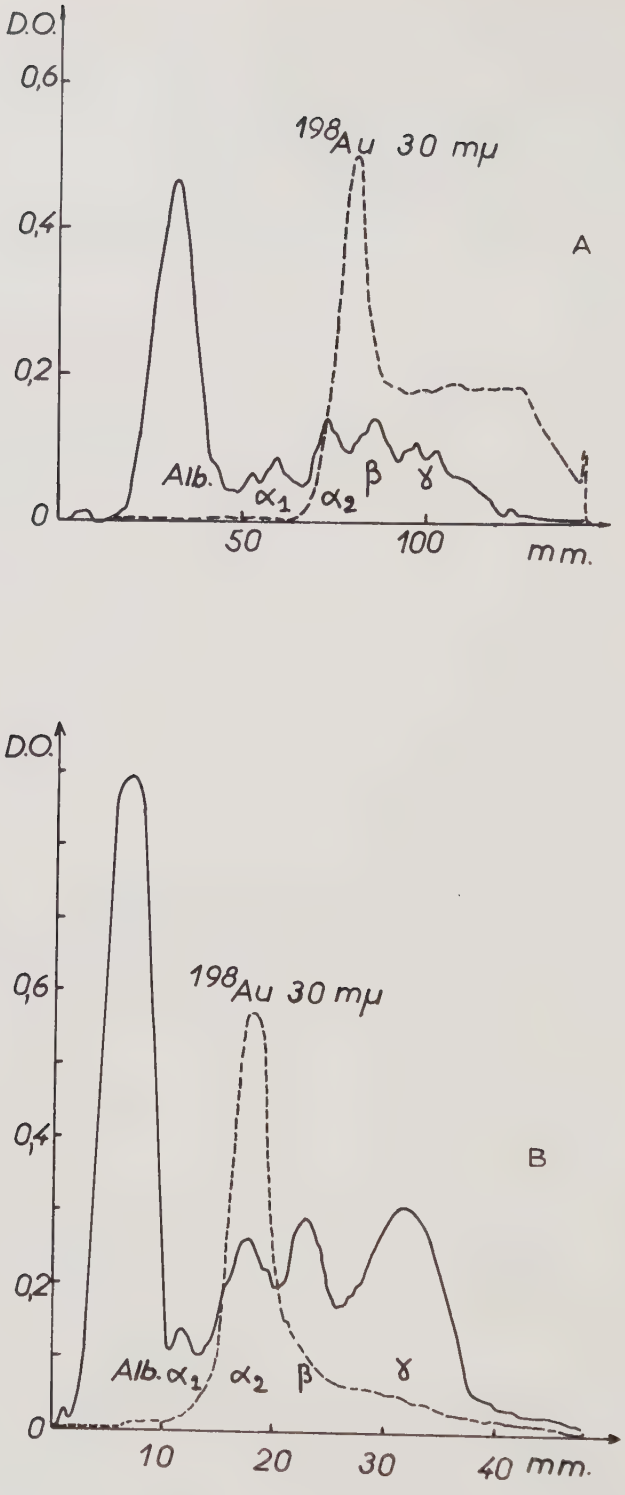



Figure 13 - Electrophorégramme A - sur papier, B - sur cellogel et autoradiographie correspondante d'un mélange effectué *in vitro* d'or colloïdal $S_2$ et de sérum humain.
(en trait plein : densité optique des protéines, en trait hachuré : densité optique des autoradiographies).

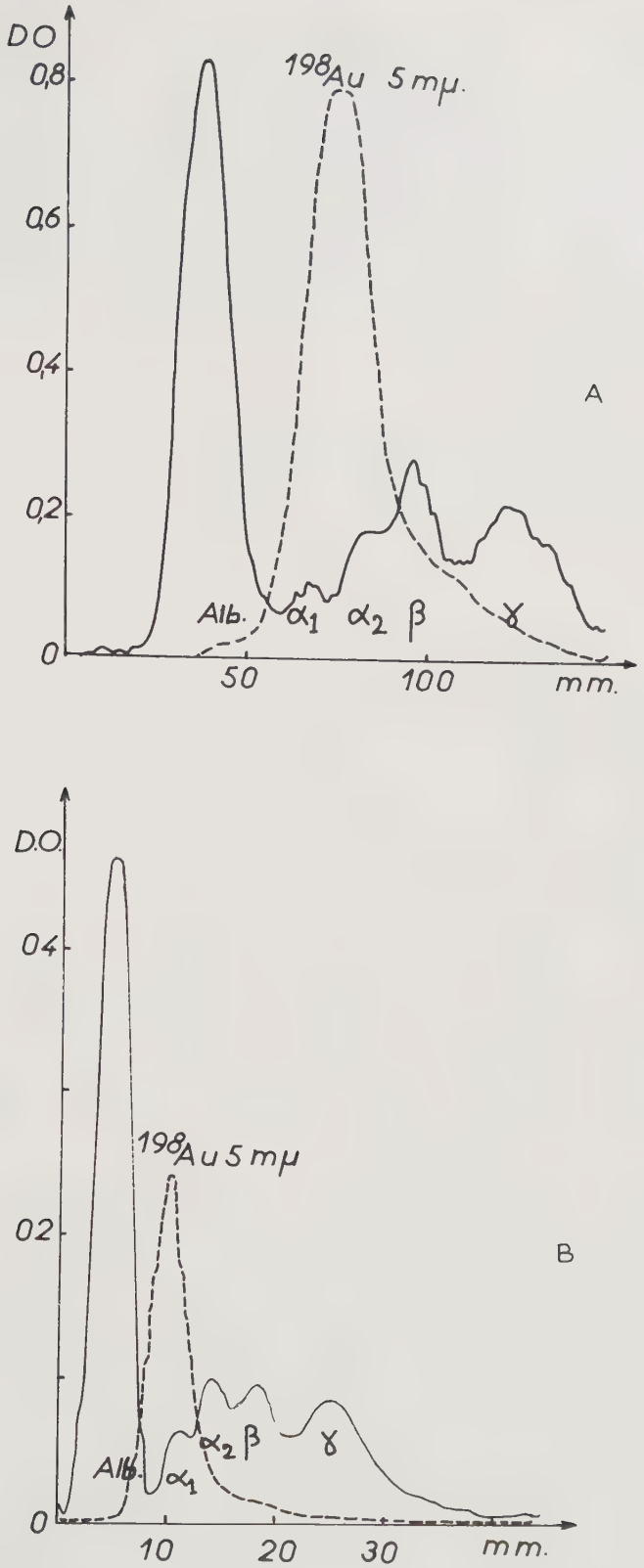



Figure 14 - Electrophorégramme A - sur papier, B - sur cellogel et autoradiographie correspondante d'un mélange effectué *in vitro* d'or colloïdal $S_6$ et de sérum humain.
(en trait plein : densité optique des protéines, en trait hachuré : densité optique des autoradiographies).

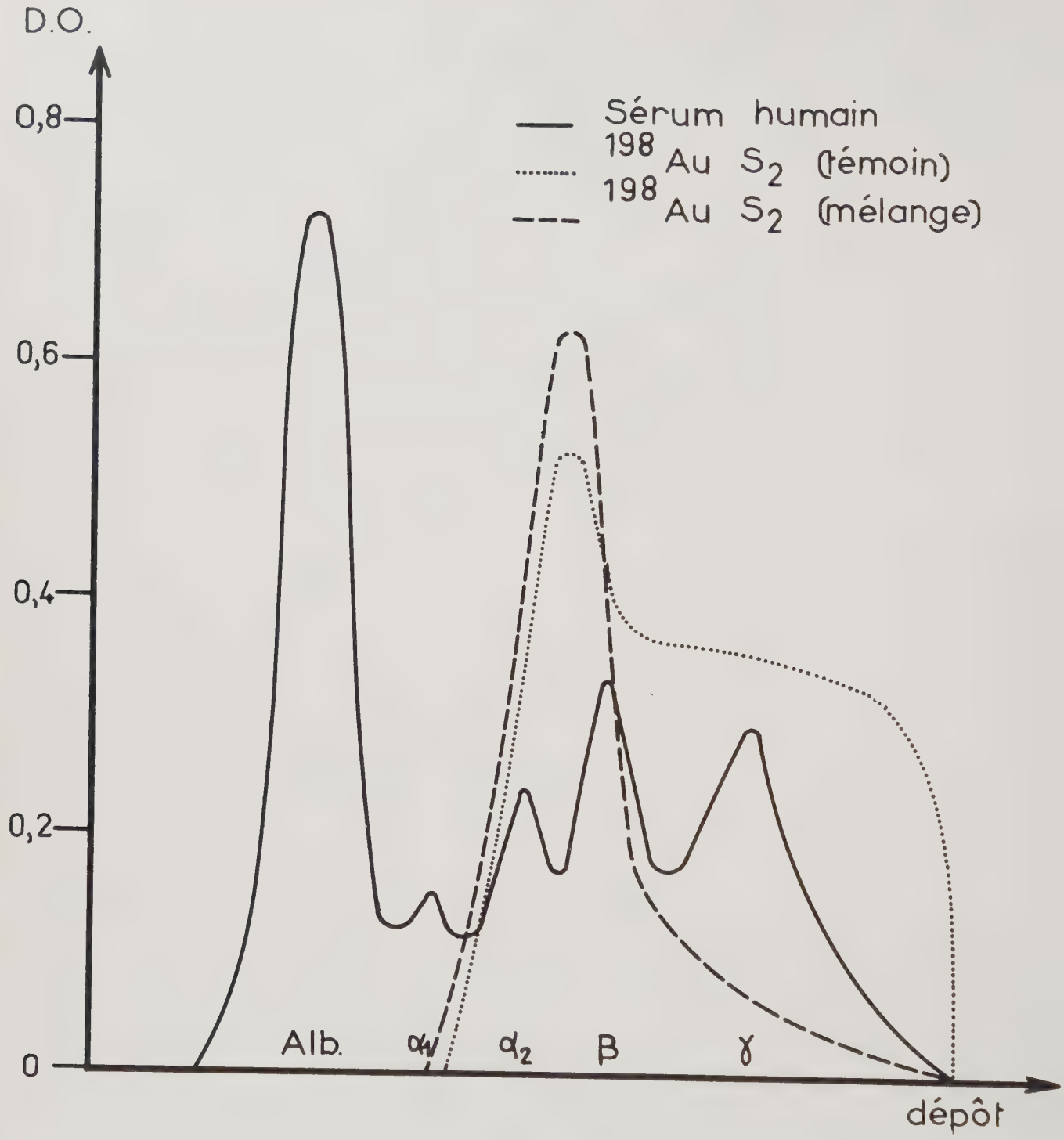
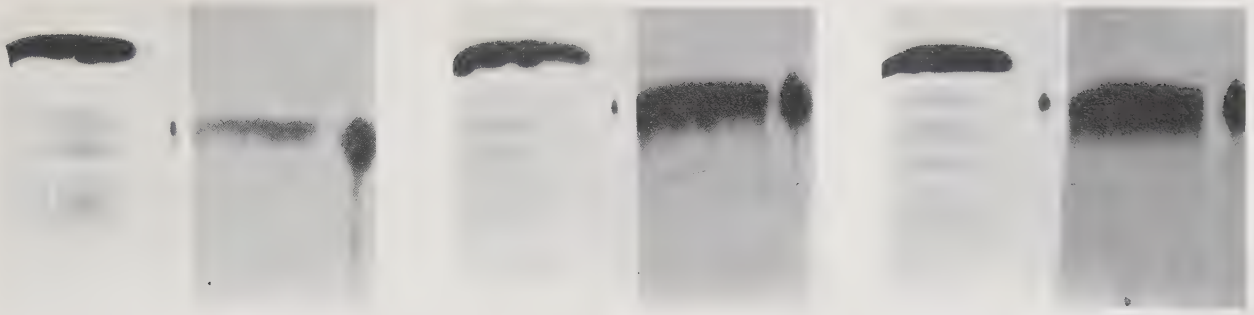



Figure 15 - Migration électrophorétique sur papier du colloïde $S_2$ et d'un mélange de sérum humain et de colloïde $S_2$.
(en trait plein : densité optique des protéines, en tirés : densité optique des autoradiographies).



$S_2$ - CEA (30 mμ) $S_6$ - CEA (5 mμ) Anglais (5 à 20 mμ)

Figure 16 - Electrophorèse sur cellogel des colloïdes
- $S_2$ seul ou mélangé au sérum humain,
- $S_6$ seul ou mélangé au sérum humain,
- Amersham seul ou mélangé au sérum humain
et autoradiographies correspondantes.

## II - CHROMATOGRAPHIE

### - Technique

Les sérums du Lapin ou du Rat sont obtenus de la même manière que précédemment.

Après dosage des protéines, on leur ajoute diverses quantités de colloïde d'or. Le sérum de Lapin reçoit par gramme de protéines 0,06 mg à 0,15 mg de colloïde $S_2$, 0,03 mg à 0,22 mg de colloïde $S_6$ et 0,18 mg à 18,4 mg de la préparation Amersham. Le colloïde $S_2$ est ajouté au sérum de Rat à des doses de 0,01 à 0,28 mg par gramme de protéines.

Après incubation de 45 minutes à 37°C avec agitation mécanique, le mélange est étalé sur la surface du gel à raison de 0,20 ml par dépôt. La chromatographie, la collection de l'éluat, le dosage des protéines et de la radioactivité contenues dans chacun des tubes sont réalisés selon le mode opératoire décrit au Chapitre IV.

Le pourcentage de colloïde libre et lié est déterminé conjointement par planimétrie des courbes et par comptage de la radioactivité de chacune des fractions.

Pour un sérum de Rat, incubé avec de l'or $S_2$, nous avons lyophylisé la fraction protéique radioactive recueillie après passage sur le séphadex. La poudre obtenue, remise en solution aqueuse, est soumise à une électrophorèse sur cellogel et la radioactivité est localisée par autoradiographie.

### - Résultats

Quelle que soit la nature du colloïde mélangé avec les sérums, une fraction de la radioactivité est identifiée entre le 36ème et le 60ème millilitre d'éluat, qui ne contient pas de protéines décelables par nos techniques. C'est dans cette portion que l'or colloïdal, déposé seul sur séphadex, est retrouvé (Chapitre IV) ; elle correspond donc à de l'or non lié.

Par contre, une partie de la radioactivité est décelée avec les protéines de Lapin ou de Rat c'est-à-dire à partir du 76ème millilitre d'éluat (fig. 17). La quantité de particules retenues par les protéines sériques peut provenir d'une liaison de l'or avec ces dernières. De ce fait nous l'appelerons "or lié" sans préjuger de la nature de la liaison.

Néanmoins le Tableau XI, qui indique le pourcentage d'or libre et d'or lié dans le sérum de Lapin et de Rat en fonction de la quantité d'or mise en contact avec les protéines, montre que :

1/ pour les faibles doses d'or, jusqu'à 0,15 mg par gramme de protéines, la fraction liée dépasse 50 % aussi bien pour le Lapin que le Rat,

2/ pour des doses plus élevées, bien que le nombre d'expériences soit insuffisant, la proportion fixée devient faible et au delà de 10 mg d'or par gramme de protéines, elle est inférieure à 5 %.

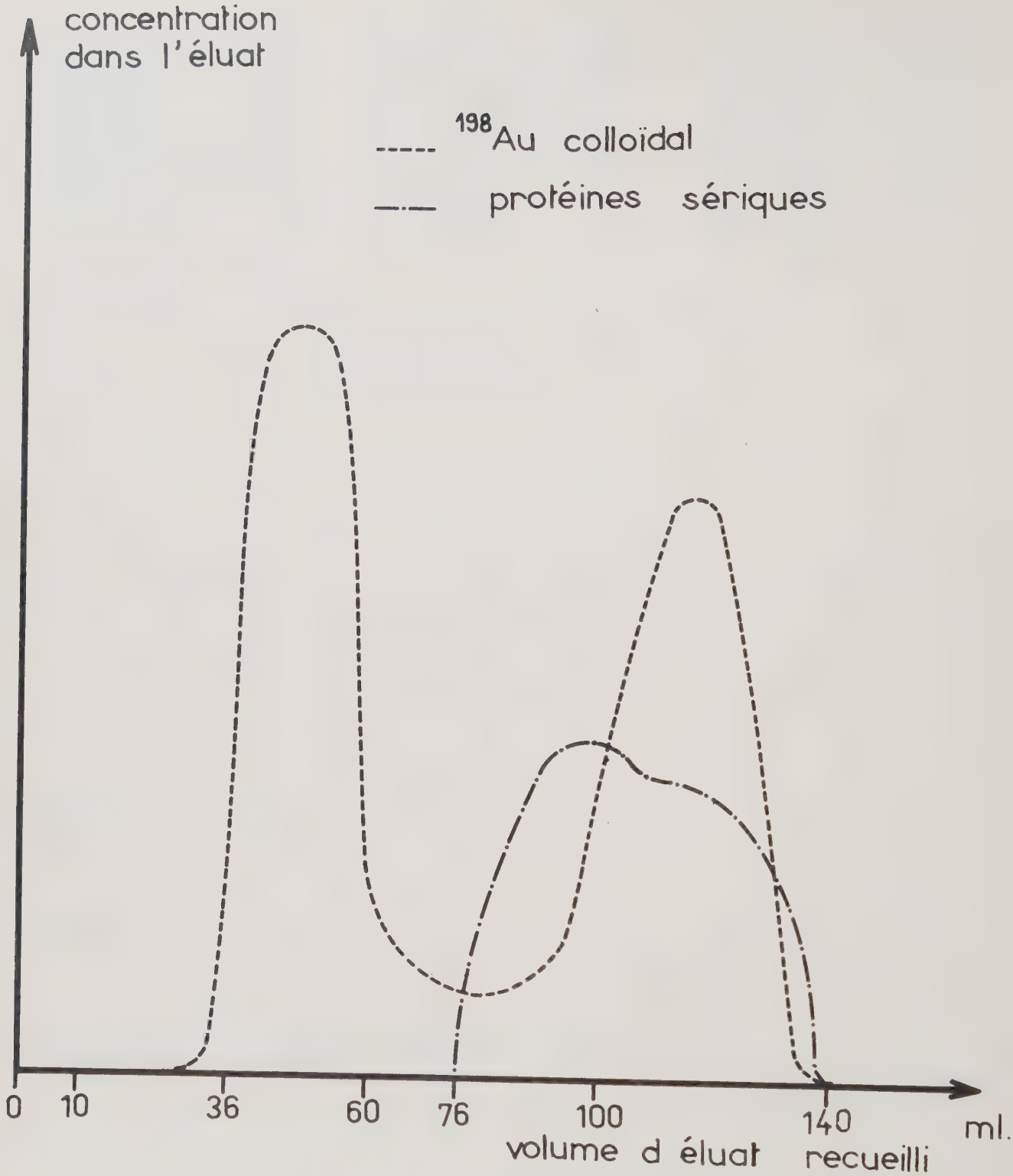


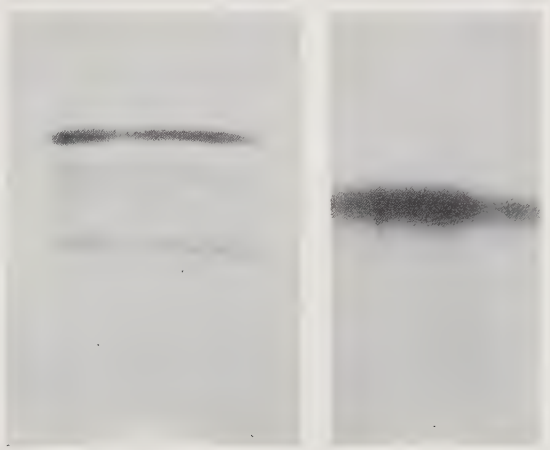

Figure 17 - Passage sur Séphadex G 200 d'un mélange d'or colloïdal 198 et de sérum de Lapin.

Tableau XI

Séparation par chromatographie sur sephadex G 200 de l'or colloïdal 198 libre de celui lié aux protéines sériques (après mélange "*in vitro*")

| Espèce animale | Nature de l'or | n° expérience | mg d'or/1 g de protéine | or libre (%) (36 ème à 60 ème ml) | or lié (%) (à partir de 76 ème ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| Lapin | Saclay $S_2$ | 1 | 0,06 | 20 | 80 |
| | | 2 | 0,10 | 15 | 85 |
| | | 3 | 0,15 | 61 | 39 |
| | Saclay $S_6$ | 4 | 0,03 | 19 | 81 |
| | | 5 | 0,15 | 55 | 45 |
| | | 6 | 0,22 | 47 | 53 |
| | Amersham | 7 | 0,18 | 1 | 99 |
| | | 8 | 1,80 | 37 | 63 |
| | | 9 | 9,20 | 98 | 2 |
| | | 10 | 18,40 | 96 | 4 |
| Rat | Saclay $S_2$ | 11 | 0,01 | 55 | 45 |
| | | 12 | 0,02 | 49 | 51 |
| | | 13 | 0,05 | 44 | 56 |
| | | 14 | 0,28 | 55 | 45 |

La portion d'or lié séparée dans le sérum du Rat et lyophylisée montre après séparation électrophorétique la présence de toutes les fractions sériques et précise que l'or $S_2$ migre au niveau des alpha 2 globulines (fig. 18). Cette constatation permet de supposer que le colloïde n'a pas été dénaturé au cours de la filtration sur gel de séphadex.



A B

Figure 18 - Electrophorégramme sur cellogel (A) et autoradiographie correspondante (B) du lyophilisat de la portion protéinique radioactive obtenue après chromatographie sur séphadex d'un mélange de sérum de Rat et de colloïde $S_2$.

## CONCLUSION

Le mélange *in vitro* de sérums humains ou animaux sains avec les colloïdes d'or $S_2$, $S_6$ ou Amersham a montré par deux méthodes d'électrophorèse que la radioactivité était située au niveau des alpha globulines : les grosses particules ($S_2$) se fixent sur les $\alpha_2$ globulines, les petites particules ($S_6$ et Amersham) sur les $\alpha_1$ globulines.

Comme l'or colloïdal seul ou l'or colloïdal mélangé aux protéines migrent à la même vitesse il n'est pas possible de conclure à une liaison par la seule étude électrophorétique. Cependant la traînée laissée par l'or seul sur support de papier disparaît lorsque le colloïde est mélangé aux protéines ; il est alors possible de penser à un entraînement. Le passage de ces mélanges sur colonne de séphadex G 200 permet de constater qu'une fraction du colloïde qui ne semble pas dénaturé reste attachée aux protéines en contractant peut être une liaison. Une autre fraction colloïdale demeure libre ; elle est d'autant plus importante que la quantité d'or ajouté au sérum est plus élevée.

La chromatographie sur séphadex permet donc de séparer l'or colloïdal seul de celui associé aux protéines alors qu'il est impossible de le faire par électrophorèse puisque les mobilités du colloïde d'or et du complexe qu'il donne avec les protéines sont identiques.

CHAPITRE VII

# ÉTUDE DE LA LIAISON *IN VIVO* DES PARTICULES COLLOIDALES D'OR 198 AVEC LES PROTÉINES SÉRIQUES DE SUJETS SAINS

*In vivo* les autoradiographies de coupes de culots, obtenus par centrifugation du sang d'animaux auxquels on a injecté de l'or colloïdal, montrent une disparition rapide de l'or 198 plasmatique. On peut se demander dans ces conditions si la comportement des colloïdes $S_2$, $S_6$ et Amersham vis-à-vis des protéines sériques, que nous venons d'étudier *in vitro*, sera retrouvé chez l'animal vivant.

L'injection des préparations colloidales est pratiquée par voie intraveineuse sur divers animaux sains. Quelques minutes après, du sang est prélevé. Le sérum recueilli après coagulation est soumis aux mêmes techniques de fractionnement que dans les expériences précédentes pratiquées *in vitro* (électrophorèse et chromatographie).

## I - ELECTROPHORESE

### - Technique

On injecte les colloïdes non dilués (afin d'éviter une quelconque dénaturation) dans la veine du penis des Rats et des Cobayes à jeun, endormis au Pentobarbital sodique par voie intraperitonéale à la dose de 40 mg/kg. Les quantités d'or administrées, variables d'un animal à l'autre et rapportées à 100 grammes de poids corporel, sont indiqués dans le Tableau XII.

Tableau XII

Conditions expérimentales pour la réalisation des mélanges "*in vivo*" de l'or colloïdal et des protéines sériques

| Animal | Nature de l'or | Nombre d'animaux | Nombre de doses | mg d'or injecté/100 g d'animal minima | maxima |
|---|---|---|---|---|---|
| Rat | $S_2$ | 9 | 4 | 0,25 | 1,40 |
| | $S_6$ | 8 | 4 | 0,42 | 1,40 |
| | Amersham | 4 | 1 | 2,70 | |
| Cobaye | $S_2$ | 6 | 2 | 0,25 | 0,35 |
| | Amersham | 2 | 1 | 0,75 | |
| Lapin | $S_2$ | 1 | 1 | 0,06 | |
| | $S_6$ | 1 | 1 | 0,16 | |

Deux lapins non anesthésiés reçoivent dans la veine marginale de l'oreille 0,6 mg et 1,6 mg d'or par kilogramme d'animal.

Le sang est prélevé entre 2 et 10 minutes après l'injection du colloïde, par ponction cardiaque chez le Rat et le Cobaye et dans la veine marginale de l'oreille opposée chez le Lapin.

Le sérum, recueilli après coagulation, est soumis au fractionnement électrophorétique. Les volumes déposés sont tels qu'ils contiennent environ 500 $\gamma$ de protéines pour les expériences sur papier et 100 $\gamma$ pour les essais sur cellogel, sachant que les sérums de Rat, Cobaye et Lapin renferment respectivement en moyenne 61 grammes, 38 grammes et 54 grammes de protides totaux par litre (HOFFMANN, 1963).

Les protéines et la radioactivité sont révélées sur les bandes par les méthodes décrites précédemment. Les densités optiques des électrophorèses et des autoradiographies correspondantes sont enregistrées au titromatic Quéré. Par planimétrie des surfaces on calcule le pour cent d'or 198 qui correspond à chaque fraction protéique.

- Résultats

La radioactivité le long des électrophorègrammes est localisée au niveau des alpha 2 globulines après injection à l'animal du colloïde $S_2$ (fig. 19) et au niveau des alpha 1 globulines après administration des préparations $S_6$ ou Amersham (fig. 20). A ces données qualitatives nous ajoutons, a titre d'exemple, des résultats quantitatifs qui donnent le pour cent de radioactivité sur les différentes fractions protéiques après électrophorèse sur cellogel de sérum de Rat ayant reçu par voie intraveineuse un colloïde d'or radioactif. Le Tableau XIII montre que la quantité d'or 198 fixée sur l'ensemble des alpha globulines est plus importante lorsqu'il s'agit d'un colloïde à petites particules que d'une préparation à grosses particules. Ainsi avec les colloïdes $S_6$ ou Amersham on retrouve 99 % de la radioactivité sur les alpha globulines, le reste se situant sur les bêta globulines ; avec le colloïde $S_2$, 76 % des grains radioactifs se localisent au niveau des alpha globulines contre 24 % au niveau des bêta globulines. Les autres fractions protéiques ne présentent pas de radioactivité. Ces chiffres prouvent donc aussi une différence de migration de l'or 198 selon son origine.

Tableau XIII

Répartition, dans les protéines sériques, de l'or 198 colloïdal injecte au rat (Cellogel).

| Nature de l'or | Fractions protéiques | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Albumine | Globulines | | |
| | | $\alpha_1$ $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| $S_2$ | 0 | 76 | 24 | 0 |
| $S_6$ | 0 | 99 | 1 | 0 |
| Amersham | 0 | 99 | 1 | 0 |

La localisation de chacune des préparations d'or, n'est pas modifiée en fonction de la dose d'or injectée ou de l'espèce animale envisagée. Le mode de fixation de la particule radioactive sur les protéines sériques n'est pas non plus influencé par l'anesthésie de l'animal. En effet, les sites radioactifs sont les mêmes chez le Lapin, qui n'a pas reçu de nembutal, et chez le Rat ou le Cobaye endormis après injection de ce produit.

Enfin, après un temps de contact prolongé des électrophorégrammes on peut constater en outre un léger noircissement des films radiographiques au niveau des albumines. Une localisation identique est observée sur les sérums de Lapin, Rat et Cobaye, recueillis 24 heures après l'injection de l'or colloïdal 198 $S_2$ (fig. 21). Cette radioactivité retrouvée au niveau des albumines est cependant minime et peut correspondre, comme dans nos expériences "*in vitro*", à la partie d'or ionique contenue dans chacune des préparations d'or colloïdal 198.

II - CHROMATOGRAPHIE

- Technique

Deux rats, anesthésiés au Pentobarbital sodique par injection intrapéritonéale, reçoivent dans la veine du pénis respectivement 0,14 mg ou 0,24 mg d'or colloïdal $S_6$ pour 100 grammes de poids corporel.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque dans les trois minutes qui suivent l'injection. Après la coagulation 0,20 ml de sérum est déposé à la surface supérieure d'une colonne de séphadex G 200.

La chromatographie est conduite et les résultats sont obtenus comme dans les expériences *in vitro*. Le pourcentage de colloïde libre et lié est déterminé conjointement par planimétrie des courbes et par comptage de la radioactivité de chacune des fractions.

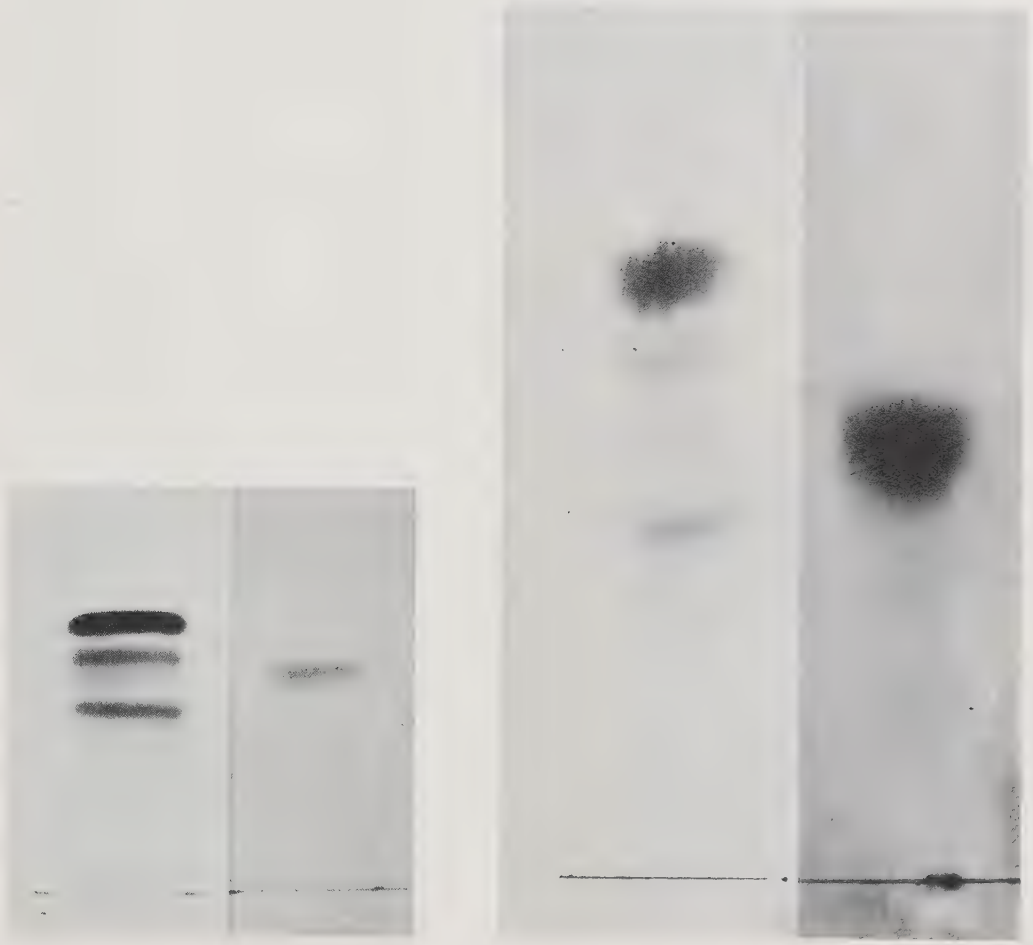



Figure 19 - Electrophorégramme A - sur cellogel, B - sur papier, et autoradiographie correspondante d'un sérum de Rat ayant reçu du colloïde $S_2$ par voie intraveineuse.

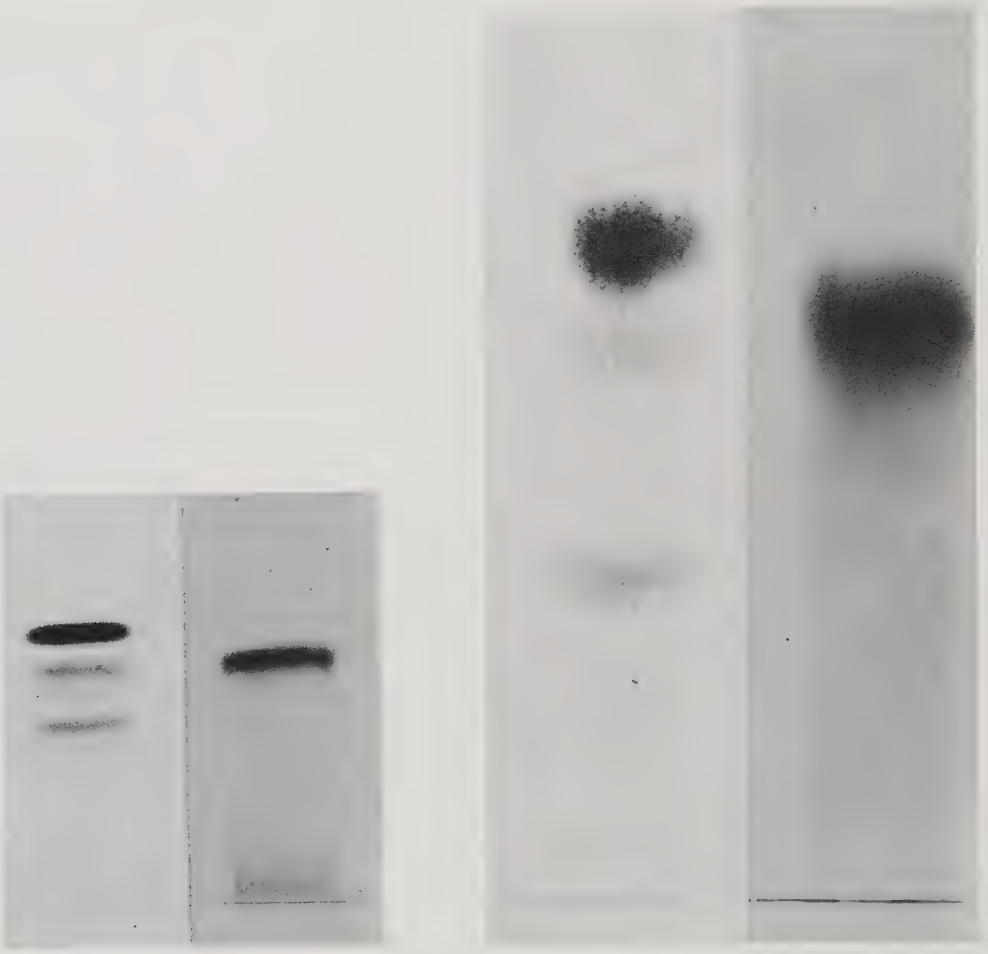



Figure 20 - Electrophorégramme A - sur cellogel, B - sur papier, et autoradiographie correspondante d'un sérum de Rat du colloïde $S_6$ par voie intraveineuse.

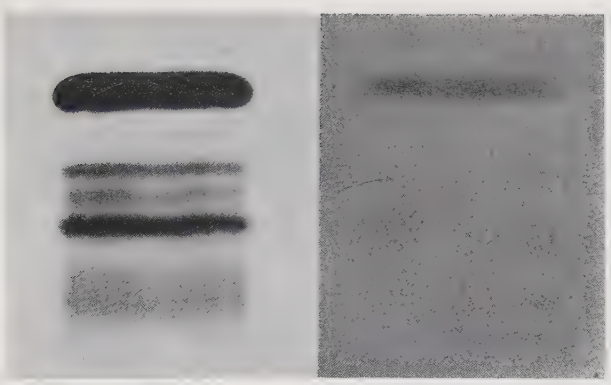


Figure 21 - Electrophorégramme et autoradiographie correspondante d'un sérum de Lapin ayant reçu 670 µg d'or par kilo d'animal de colloïde $S_2$ par voie intraveineuse (24 heures de survie).

- Résultats

Les mélanges protéines sérique-or 198 réalisés "*in vivo*" donnent après passage sur colonne de séphadex G 200 à côté d'une fraction d'or libre une fraction d'or liée aux protéines. Cette dernière renferme 90 % des particules d'or 198 après injection de 0,14 mg de colloïde par 100 g d'animal et 40 % après injection de 0,24 mg de ce même colloïde.

CONCLUSION

"*In vivo*" les résultats sont exactement superposables à ceux que nous avons obtenus *in vitro*. Par électrophorèse on décèle l'or 198 au niveau des alpha globulines : les grosses particules colloïdales ($S_2$) suivent le sort des alpha 2 globulines, les petites particules ($S_6$ et Amersham) celui des alpha 1 globulines. Après 24 heures signalons qu'une légère radioactivité est retrouvée au niveau des albumines.

Par filtration sur gel de séphadex on observe que la majeure partie de l'or colloïdal est retenue par les protéines sériques du Rat.

CHAPITRE VIII

# ÉTUDE DE LA LIAISON DE L'OR IONIQUE 198 AUX PROTÉINES SÉRIQUES

Plusieurs auteurs (BELLION, GHEMI et coll., 1957 - GALLE, RAYNAL et coll., 1965), ont retrouvé de la radioactivité au niveau des albumines après fractionnement électrophorétique d'un sérum mélangé *in vitro* ou *in vivo* avec de l'or colloïdal. Nous-mêmes, au cours de nos expériences, avons constaté que les albumines étaient susceptibles de transporter une fraction de l'or 198 mis à incuber avec du sérum.

Comme les préparations d'or colloïdal contiennent toutes de l'or soluble (0,01 à 2 %) il nous a paru nécessaire d'étudier en présence de protéines sériques le comportement de l'or ionique qui serait peut-être responsable de la fixation sur les albumines. Dans ce but nous avons d'une part préparé des solutions de chloraurate de sodium ($^{198}$Au) et d'autre part étudié la liaison éventuelle de cette préparation d'or ionique avec les protéines sériques par électrophorèse.

## I - PREPARATION DE CHLORAURATE ($^{198}$Au) DE SODIUM

Le chloraurate de sodium obtenu au C.E.A. comme intermédiaire de la préparation de l'or colloïdal ne présente pas un caractère de stabilité suffisant pour nos expériences ; en effet, son alcalinité conduit à une floculation rapide. Cela nous a amené à préparer nous-même du chloraurate de sodium à partir de feuilles d'or irradié (*).

### - Préparation

Elle est conduite en deux étapes :

1/ Obtention de l'acide chloraurique

2/ Neutralisation de la solution d'acide chloraurique par la soude normale.

#### 1/ Obtention de l'acide chloraurique

500 mg d'or irradié sont dissous dans 4 ml d'eau régale. Après addition de 2 ml d'eau, le mélange est évaporé à sec puis repris par de l'eau bipermutée jusqu'à un volume de 65 ml.

La solution d'acide chloraurique est limpide, jaune franc, de pH voisin de 1,3. Le produit est stable dans le temps.

#### 2/ Neutralisation de l'acide chloraurique par la soude

La courbe de neutralisation de l'acide chloraurique par la soude enregistrée à l'aide d'un titromatic Quéré présente deux points d'inflexion (fig. 22). Le premier observé à pH 2 correspond à la neutralisation de l'excès d'eau régale non éliminée au cours de l'évaporation ; le deuxième, qui provient de la transformation de l'acide en sel, apparaît à pH voisin de 6. Au delà l'excès de soude accroît très vite le pH et entraîne la floculation de la préparation.

Ces constatations nous ont amené à arrêter l'addition de soude lorsque le pH atteint 6. Dans ces conditions le chloraurate de sodium est stable dans le temps.

---

(*) Nous remercions Madame FALCONI et Monsieur CARRE pour leur aide dans la réalisation de ces solutions.

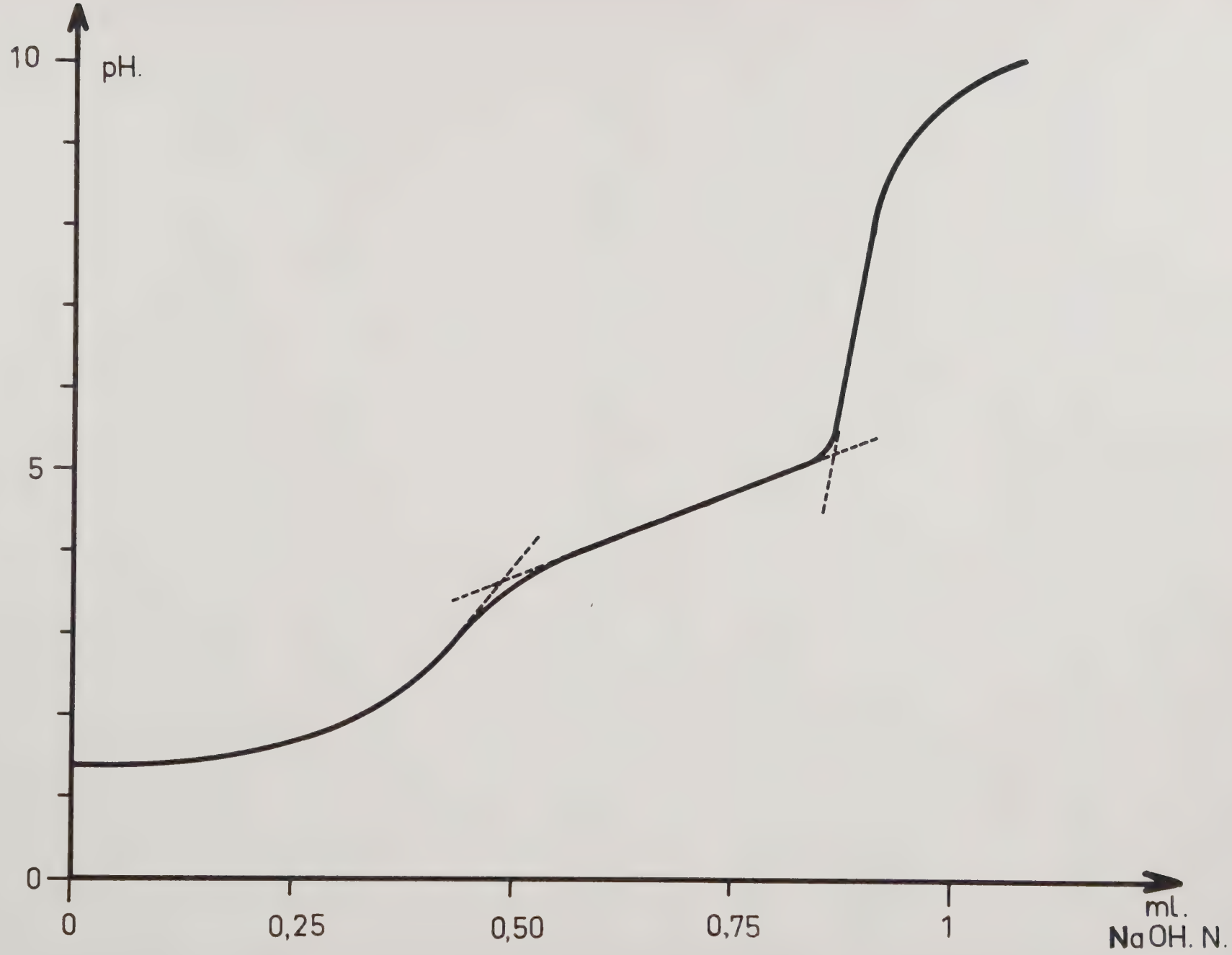



Figure 22 - Courbe de neutralisation d'une solution d'acide chloraurique par la soude normale.

- Caractères de la préparation

Liquide limpide, jaune franc, contenant 7,2 mg d'or par ml sous forme soluble ainsi que nous l'avons vérifié par chromatographie ascendante sur papier selon la technique appliquée pour le contrôle de l'or colloïdal (Chapitre I).

## II - LIAISON DE L'OR IONIQUE $^{198}Au$ AVEC LES PROTEINES SERIQUES

La solution de chloraurate de sodium est mise à incuber *in vitro* avec du sérum ou injectée par voie intraveineuse à diverses espèces animales. Après un certain temps le sérum est fractionné par électrophorèse afin de préciser la localisation de l'or par autoradiographie.

- Technique

1/ *In vitro*

Le sérum humain et ceux de lapins, cobayes et rats sont mis à incuber à 37°C pendant 45 minutes avec des doses d'or ionique comprises entre 0,01 et 40 mg d'or par gramme de protéines. Après ce délai on effectue des électrophorèses sur papier et sur cellogel par rapport à des témoins d'or soluble. La radioactivité est révélée par autoradiographie, les protéines sont colorées par le noir amido. Les proportions relatives de chacune des fractions sont déterminées après enregistrement de la densité optique le long des bandes, lue au titromatic Quéré.

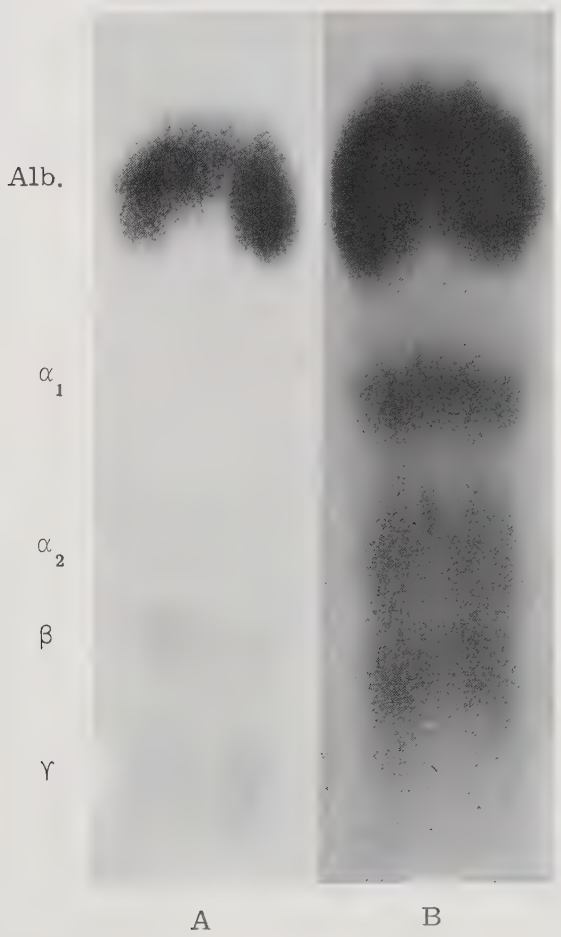



Figure 23 - Electrophorégramme sur papier (A) et autoradiographie correspondante (B) d'un sérum humain mélangé *in vitro* à 20 mg d'or ionique 198 par gramme de protéines.

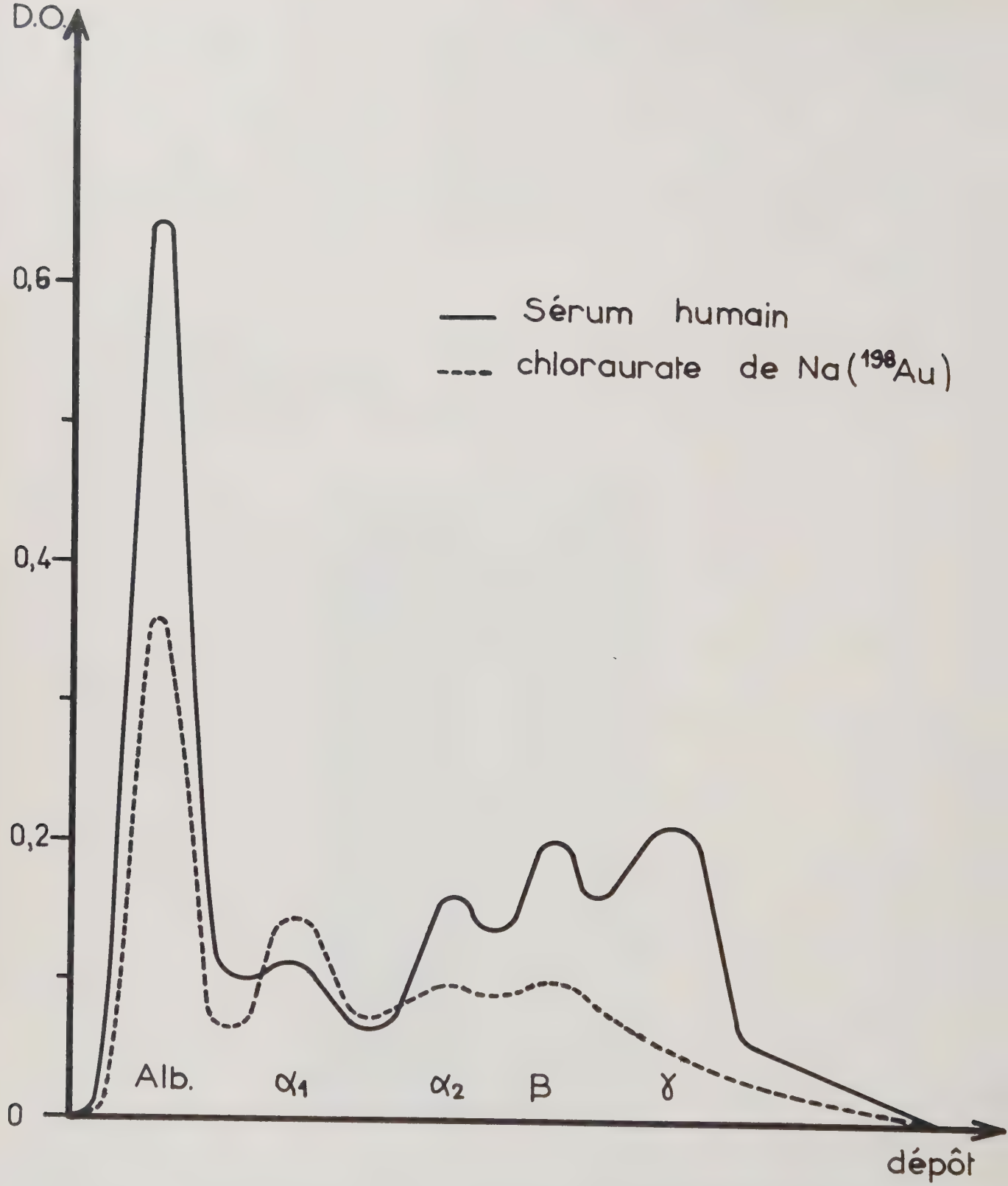



Figure 24 - Enregistrement de la densité optique de l'électrophorégramme et de l'autoradiographie correspondante d'un sérum humain mélangé "*in vitro*" à 20 mg d'or ionique par gramme de protéines.

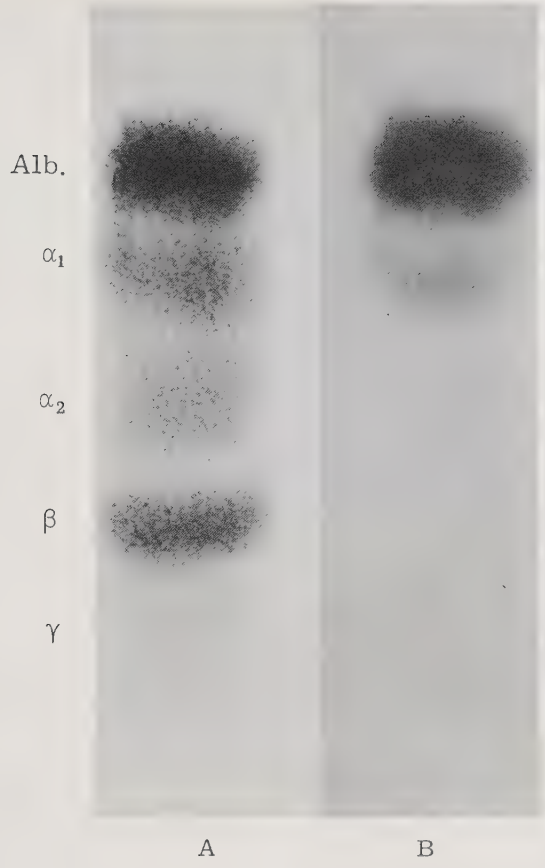



Figure 25 - Electrophorégramme sur papier (A) et autoradiographie correspondante (B) d'un sérum de Rat prélevé 1 heure après injection intraveineuse d'or ionique.

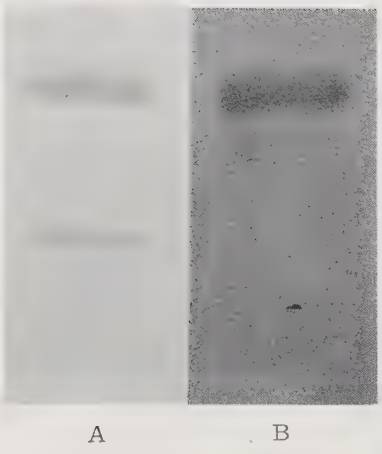



Figure 26 - Electrophorégramme sur cellogel (A) et autoradiographie correspondante (B) d'un sérum de Lapin prélevé 1 heure après injection intraveineuse d'or ionique.

2/ *In vivo*

Deux lapins, un cobaye et trois rats, sont utilisés dans cette expérience. Les animaux des trois espèces reçoivent par voie intraveineuse respectivement 75, 600 et 1 560 µg d'or ionique pour 100 g de poids corporel. Après un temps variable (5 minutes à 24 heures) on prélève le sang veineux à l'oreille du lapin ou le sang artériel par ponction cardiaque chez le cobaye et le rat.

Après coagulation le sérum est soumis aux techniques de séparation décrites dans les expériences *in vitro*.

- Résultats

La migration de l'or ionique seul est différente de celle qu'il a, mélangé avec du sérum.

*In vitro*, l'or ionique est fixé sur toutes les fractions protéiniques sauf sur les gamma globulines (fig. 23). Pour une concentration inférieure à un mg d'or par gramme de protéines la radioactivité est surtout concentrée au niveau des albumines ; pour des concentrations plus élevées la fixation devient plus diffuse, elle s'observe d'abord sur les alpha globulines puis les beta globulines (fig. 24) ; elle demeure nénamoins prépondérante sur les albumines.

*In vivo*, l'or soluble est retrouvé quelques minutes après l'injection sur les albumines et un peu sur les alpha 1 globulines quelle que soit la dose administrée (fig. 25 et 26). Pour des temps de survie plus prolongés seule la fraction albuminique présente une affinité pour le métal. On peut penser de ce fait que l'or quitte rapidement le courant circulatoire puisque les caractères de la fixation correspondent à ceux qui sont obtenus *in vitro* avec de très faibles doses d'or ionique.

## CONCLUSION

Nous signalons l'importance de la neutralisation de l'acide chloraurique en chloraurate de sodium par la soude. Au-delà du pH 6 la solution n'est plus stable dans le temps.

Mis à incuber avec le sérum nous montrons par électrophorèse sur support que l'or ionique 198 se lie aux protéines, la migration du témoin d'or étant différente. En plus de sa fixation sur les albumines, fait abondamment signalé dans la littérature, nous prouvons que dans certaines conditions la liaison intéresse aussi les autres protéines sériques. En effet si les ions auriques présentent une affinité particulière pour les albumines aux faibles doses, aux doses plus élevées les autres fractions protéiques à l'exception des gamma globulines sont susceptibles de fixer le métal.

CHAPITRE IX

# ÉTUDE DE LA LIAISON *IN VITRO* DES COLLOIDES D'OR AVEC LES PROTÉINES DES LIQUIDES D'ÉPANCHEMENT

De nombreux auteurs ont étudié par électrophorèse sur support les sérums et les liquides d'épanchement de malades atteints de néoplasies (VANNINI, IPPOLITO, 1956 - SHAW, BREWS, 1950 - MIDER, ALLING et coll., 1959 - ROVELSTAD, BARTHOLOMEW et coll., 1958).

Ces travaux ont conduit à diverses conclusions :

1/ la protéinémie chez les cancéreux est plus faible que chez les sujets normaux,

2/ les valeurs relatives et absolues de l'albumine chez les cancéreux sont inférieures à celles des sujets normaux,

3/ les globulines totales ont un taux plus élevé dans le sérum des cancéreux que dans celui des sujets sains. Cette augmentation provient d'un accroissement des globulines $\alpha_1$ et $\alpha_2$.

CEIA, CLODE et coll. (1960) ont d'autre part comparé dans les sérums et les liquides d'épanchement des cancéreux les variations des protéines totales, de l'albumine et des globulines. Les modifications des protéines sériques totales sont toujours suivies de perturbations parallèles dans les exsudats, portant sur toutes les fractions et en particulier sur le taux des $\alpha_1$ et $\alpha_2$ globulines.

A la teneur près, les protéines des liquides d'épanchement sont très représentatives des protéines sériques de l'invididu sur lequel ce liquide a été prélevé.

En liaison avec le Service de Curietherapie de l'Institut Gustave Roussy(*), nous avons pu de ce fait étudier la fixation de l'or colloïdal dans le liquide d'ascite et le liquide pleural des cancéreux sans nous attarder sur leur sérum sanguin.

Ces deux exsudats, qui proviennent de régions enflammées riches en éléments su S. R. E. et contiennent une forte teneur en alpha globulines, vont nous permettre de voir si le pouvoir de rétention de l'or colloïdal 198 par ces dernières est modifié.

Dans un premier temps nous avons déterminé les protéines totales et les pourcentages respectifs des diverses fractions protéiques dans les liquides ascitiques et pleuraux afin de comparer ces résultats à ceux qui sont obtenus avec un sérum normal.

Dans un deuxième temps nous avons cherché à savoir, après incubation de ces exsudats avec de l'or colloïdal *in vitro*, si le pouvoir de rétention des particules par les protéines qu'ils contiennent était identique à celui des protides sériques d'un sujet normal.

## I - ETUDE DES PROTEINES DES LIQUIDES D'EPANCHEMENT

Les liquides d'épanchement obtenus par ponction dans les cavités néoplasiques présentent des caractères macroscopiques variables. La ponction retire parfois un liquide citrin, séro-fibrineux, pauvre en cellules ; dans d'autres cas l'épanchement est hémorragique ou séro-hémorragique. Plus rarement encore il peut être chyliforme.

Les prélèvements obtenus sont conservés 24 heures à + 4°C afin d'obtenir, après décantation, un liquide limpide.

---

(*) Nous remercions Monsieur le Professeur PIERQUIN (Institut Gustave Roussy, Villejuif) qui a mis à notre disposition les liquides d'ascite et pleuraux.

- Technique

Les protéines sont dosées par la réaction du biuret suivant la méthode de GORNALL, BARDOWILL et coll. (1949) (Chapitre IV).

Le fractionnement électrophorétique est effectué sur papier ou cellogel par la méthode habituelle. Après coloration le pourcentage de chaque fraction est déterminé en mesurant la densité optique le long de la bande à l'aide du Titromatic Quéré. La planimétrie des différents pics permet de déterminer le pourcentage de chacune des fractions protéiques. Celles-ci sont exprimées en poids en rapportant le pourcentage au taux de protéines par litre.

- Résultats

Les liquides étudiés renferment de 35 à 45 grammes de protéines par litre (Tableau XIV) ce qui nous permet de les classer parmi les exsudats puisque les transsudats sont pauvres en protéines. Cette teneur en protides est environ deux fois moins élevée que dans le sérum.

Sur papier (Tableau XIV), le fractionnement montre une diminution du taux et du pourcentage des albumines par rapport à celui du sérum humain normal. En pourcentage les fractions globuliniques sont augmentées mais seules les $\alpha_1$ globulines le sont de manière appréciable.

Sur cellogel (Tableau XV), les pourcentages en albumine trouvés dans les épanchements sont plus élevés que ceux obtenus sur papier. Nous retrouvons toutefois le même phénomène : seules les $\alpha_1$ globulines contenues dans les liquides d'épanchement ont une teneur pondérale accrue, double de celle d'un sérum normal.

Tableau XIV

Résultat obtenu après fractionnement électrophorétique sur papier de divers liquides biologiques

| Liquide | Protides totaux g/l | Albumines | | Globulines | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $\alpha_1$ | | $\alpha_2$ | | $\beta$ | | $\gamma$ | |
| | | % | g/l | % | g/l | % | g/l | % | g/l | % | g/l |
| Ascite I | 35 | 38,4 | 13,5 | 11,4 | 4 | 11,4 | 4 | 14 | 4,9 | 24,1 | 8,5 |
| II | 45 | 34,2 | 15,4 | 11,9 | 5,4 | 13,1 | 5,9 | 15,6 | 7 | 25 | 11,2 |
| III | 42 | 41,5 | 17,4 | 8,9 | 3,7 | 8,1 | 3,4 | 17,8 | 7,5 | 23,7 | 10 |
| IV | 45 | 34,7 | 15,4 | 11,9 | 5,4 | 12,3 | 3,5 | 14,4 | 6,5 | 26,6 | 12 |
| V | 45 | 37,2 | 16,8 | 11 | 5 | 11,2 | 5 | 15,4 | 7 | 24,8 | 11,2 |
| Pleural I | 44 | 31 | 13,6 | 10,6 | 4,7 | 13,1 | 5,7 | 15 | 6,6 | 30 | 13,2 |
| II | 39 | 33,1 | 12,9 | 10,6 | 4,2 | 14,4 | 5,6 | 17,1 | 6,6 | 24,6 | 9,6 |
| III | 44 | 34,4 | 15,1 | 11,5 | 5 | 14,8 | 6,5 | 14,8 | 6,5 | 24,3 | 10,6 |
| Sérum Humain (1) | 75 | 57 | 42,7 | 4 | 3,0 | 7 | 5,2 | 12 | 9,0 | 17 | 12,7 |
| Normal (2) | | 57,8 | 43,3 | 4,5 | 3,3 | 8,2 | 6,1 | 9,6 | 7,2 | 19,9 | 14,9 |
| (3) | | 59,9 | 44,9 | 4,1 | 3,1 | 8,9 | 6,6 | 10,1 | 7,5 | 17 | 12,7 |
| (4) | | 52,6 | 39,5 | 5 | 3,7 | 8 | 6 | 13 | 9,7 | 21,3 | 16 |

(1) GIRARD M. et coll. (1958)
(2) KORVER G. (1950) et (1953)
(3) PLUCKTHUN H. et coll. (1951)
(4) Travaux personnels (moyenne de 5 expériences)

Cette étude nous montre la similitude existant entre un liquide pleural et un liquide d'ascite de cancéreux tant du point de vue teneur en protéines que du point de vue fractionnement électrophorétique (fig. 27). De plus, nous avons constaté, par rapport au sérum humain normal, une augmentation pondérale des $\alpha_1$ globulines dans ces épanchements qui est illustrée par la figure 28.

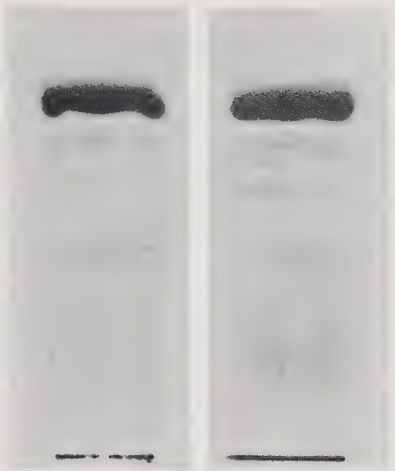



Figure 27 - Fractionnement électrophorétique
(A) Liquide d'ascite,
(B) Liquide pleural.

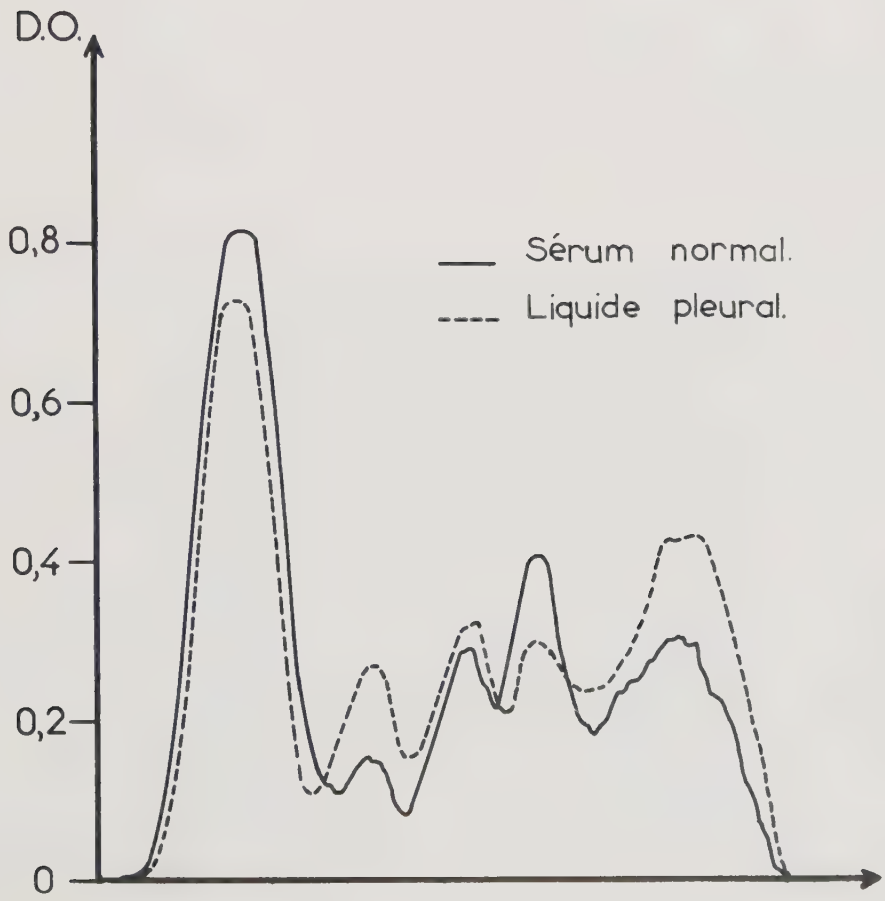



Figure 28 - Electrophorégramme sur cellogel d'un sérum normal et d'un liquide pleural.

Tableau XV

Résultats obtenus après fractionnement électrophorétique sur cellogel de divers liquides biologiques

| Liquie | Protides totaux g/l | Albumine | | Globulines | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $\alpha_1$ | | $\alpha_2$ | | $\beta$ | | $\gamma$ | |
| | | % | g/l | % | g/l | % | g/l | % | g/l | % | g/l |
| Ascite I | 35 | 57 | 20 | 8 | 2,8 | 6,8 | 2,4 | 10,2 | 3,8 | 17,1 | 6 |
| II | 45 | 53 | 23,8 | 8,9 | 4 | 6,7 | 3 | 8,9 | 4 | 22,3 | 10 |
| III | 42 | 53,8 | 22,6 | 10,2 | 4,3 | 7,7 | 3,4 | 10,2 | 4,3 | 18 | 8,1 |
| Moyenne | | 54,6 | 22,1 | 9 | 3,7 | 7 | 2,9 | 9,7 | 4 | 19,1 | 8 |
| Pleural I | 44 | 54,7 | 24 | 9,5 | 4,2 | 8,2 | 3,6 | 8,2 | 3,6 | 19,1 | 8,4 |
| II | 39 | 54,7 | 19,7 | 9,1 | 3,3 | 6,8 | 2,5 | 7,3 | 2,6 | 21,9 | 7,9 |
| III | 44 | 50,1 | 22 | 9,2 | 4 | 6,3 | 2,8 | 10,3 | 4,5 | 23,9 | 10,5 |
| Moyenne | | 53,1 | 21,9 | 9,2 | 3,8 | 7,1 | 2,9 | 8,6 | 3,6 | 21,6 | 8,9 |
| Sérum humain normal (moyenne sur 5 expériences) | 75 | 58 | 43,5 | 3 | 2,2 | 7 | 5,2 | 12 | 9 | 18 | 13,5 |

## II - ETUDE DE LA LIAISON DES COLLOIDES D'OR ET DES PROTEINES DE LIQUIDES D'EPANCHEMENT

- Technique

Nous avons étudié le comportement des colloïdes $S_2$, $S_6$ et Amersham vis-à-vis des liquides ascitiques ou pleuraux. Ceux-ci sont additionnés de quantités d'or variables qui sont indiquées dans le Tableau XVI. Les doses de colloïde ajoutées par gramme de protéines sont importantes ; elles s'étalent de 8 mg à 143 mg pour le liquide d'ascite et de 2 mg à 27 mg pour le liquide pleural.

Les mélanges sont mis à incuber à 37°C pendant 45 minutes avec agitation mécanique. Après ce délai ils sont déposés sur papier ou sur cellogel pour effectuer les électrophorèses. Des bandes témoins avec de l'or colloïdal sont mises à migrer dans les mêmes conditions. On révèle la radioactivité le long de l'électrophorèse par autoradiographie. La densité optique le long des films est enregistrée à l'aide du Titromatic Quéré. Les surfaces des pics sont planimétrées aux fins d'attribuer à chacune des fractions du protéïnogramme correspondant leur part de radioactivité.

- Résultats

Le colloïde $S_2$, mélangé aux liquides ascitiques ou pleuraux d'origine néoplasique, est retrouvé au niveau des $\alpha_2$ globulines et ceci quelle que soit la dose d'or ajoutée. Par contre les particules radioactives contenues dans les préparations $S_6$ et Amersham, mélangées dans les mêmes conditions, se concentrent au même endroit que les $\alpha_1$ globulines (fig. 29). Ces résultats qualitatifs, retrouvés aussi bien sur papier que sur cellogel, sont confirmés quantitativement. En effet, le Tableau XVII, qui indique à titre d'exemple les pourcentages de radioactivité dans les fractions protéiques de liquide d'ascite mélangés *in vitro* avec les colloïdes $S_2$ ou $S_6$, montre une migration différente de l'or selon son origine et selon le support sur lequel est effectué le fractionnement électrophorétique.

Sur support de papier, avec le colloïde $S_2$, on retrouve au niveau des alpha 2 et $\beta$ globulines 76 % de la radioactivité ; le reste s'étale le long des $\gamma$ globulines. Sur support de cellogel 99 % des particules d'or se concentrent au niveau de cette première zone contre 1 % sur le reste du protéinogramme.

Dans le cas des colloïdes à petites particules ($S_6$) et sur papier, 75 % des particules se concentrent sur les $\alpha$ globulines, 23 % sur $\beta$ globulines et 2 % sur les $\gamma$ globulines. Sur cellogel on retrouve une condensation des grains d'or 198 plus importante sur les $\alpha$ globulines (95 %) et moïndre sur les $\beta$ globulines (5 %).

Tableau XVI

Conditions expérimentales pour la réalisation des mélanges "*in vitro*" de l'or colloïdal avec les protéines des liquides d'épanchement

| Liquide | Protides totaux | Nature de l'or | Poids d'or en mg/g de protéine | Nombre d'expériences | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | sur papier | sur cellogel |
| Ascite I | 45 g/l | $S_2$ | 40 | 5 | |
| | | $S_6$ | 40 | 5 | |
| | | Amersham | 100 | 5 | |
| II | 35 g/l | $S_2$ | 57 | 3 | 3 |
| | | $S_6$ | 57 | 3 | 3 |
| | | Amersham | 143 | 3 | 3 |
| III | 45 g/l | $S_2$ | 35 | 7 | 3 |
| | | $S_6$ | 35 | 7 | 3 |
| | | Amersham | 100 | 6 | 3 |
| IV | 42 g/l | $S_2$ | 8 ou 16 | 4 | 5 |
| | | $S_6$ | 8 ou 16 | 4 | 5 |
| | | Amersham | 23 ou 47 | 2 | 2 |
| V | 45 g/l | Amersham | 62 | | 3 |
| Pleural I | 44 g/l | $S_2$ | 2 | 5 | |
| II | 39 g/l | $S_2$ | 10 | 3 | 3 |
| | | $S_6$ | 10 | 3 | 3 |
| | | Amersham | 27 | 3 | 3 |

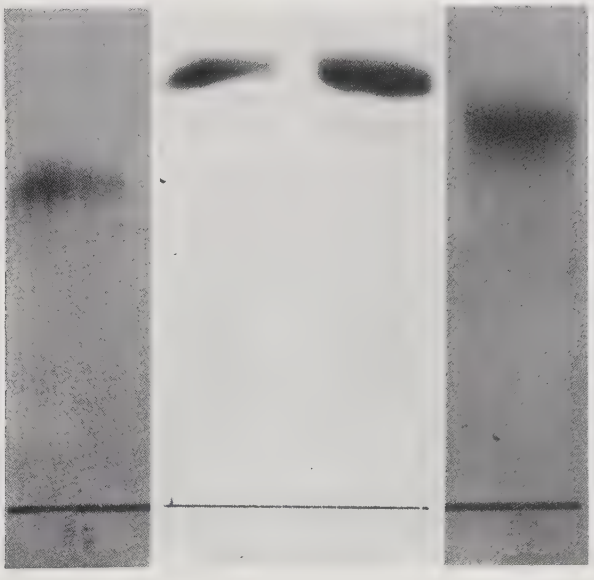



Figure 29 - Electrophorégramme et autoradiographie correspondante d'un liquide d'ascite mélangé en (A) au colloïde $S_2$, en (B) au colloïde $S_6$.

L'or colloïdal seul ou mélangé aux protéines a la même vitesse de migration. Il nous faut cependant signaler que sur papier la traînée laissée par le colloïde est beaucoup moins importante lorsqu'il est mis à incuber avec les exsudats que lorsqu'il est ensemencé seul.

Tableau XVII

Répartition de l'or 198 colloïdal dans les protéines de liquide d'ascite

| Nature de l'or | Support | Albumine | Globulines | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| $S_2$ | Papier | 0 | 0 | 76 | 24 | |
| | Cellogel | 0 | 0 | 99 | 1 | |
| $S_6$ | Papier | 0 | 75 | 23 | 2 | |
| | Cellogel | 0 | 95 | 5 | 0 | |

- CONCLUSION

Les colloïdes d'or, mélangés *in vitro* aux protéines contenues dans les liquides d'origine néoplasique (pourcentage d'$\alpha_1$ et $\alpha_2$ globulines plus important que dans un sérum humain normal) sont retrouvés selon la taille de leurs particules avec les $\alpha_1$ ou $\alpha_2$ globulines après fractionnement par électrophorèse. Ces résultats sont identiques à ceux observés après fractionnement électrophorètique des mélanges de sérum humain normal avec les préparations d'or colloïdal 198 et laissent penser que les colloïdes sont liés aux protéines des liquides d'épanchement cancéreux.

CHAPITRE X

# ÉTUDE DE LA LIAISON *IN VIVO* DES COLLOIDES D'OR AVEC LES PROTÉINES SÉRIQUES ET EXSUDATIVES DU RAT PORTEUR D'UNE INFLAMMATION EXPÉRIMENTALE LOCALE

A la suite des résultats exposés au chapitre précédent nous nous sommes préoccupé d'étudier plus longuement ces phénomènes en nous adressant à l'expérimentation animale.

On sait qu'un radiocolloïde, de taille déterminée, injecté dans une cavité saine diffuse vers le foie. Au contraire lorsqu'il est introduit dans une cavité provenant d'un état pathologique les particules radioactives se fixent sur les séreuses péricavitaires après phagocytose par les macrophages (Chapitre III). Ces constatations, à propos de l'or colloïdal, ont été faites d'une part chez l'animal sain (COHEN, COSTEROUSSE et coll., 1964), et d'autre part chez l'homme atteint d'épanchement d'origine néoplasique (CONSTANT, MAISIN et coll., 1960).

Il nous a paru intéressant de provoquer chez le Rat une inflammation locale suivie d'un processus exsudatif afin d'étudier :

1/ les modifications des protéines sériques,

2/ la liaison de l'or colloïdal avec ces protéines modifiées,

3/ le comportement de l'or injecté dans la cavité inflammatoire.

## I - LES PROTEINES SERIQUES CHEZ LES RATS NORMAUX ET LES RATS PORTEURS DE FOYERS INFLAMMATOIRES LOCAUX

Chez l'Homme le taux des différentes fractions protéiques séparées par électrophorèse n'est pas identique dans le sérum des sujets sains et celui des individus cancéreux (Chapitre IX).

Expérimentalement chez le Rat il est possible de provoquer des variations qualitatives et quantitatives nettes des protéines sériques en créant diverses perturbations métaboliques telles que : intoxications (LAWFORD, 1960 - RIOU, TRUHAUT, PAOLETTI, 1962), hépatectomie (HEIM et KERRIGAN, 1963 - BOFFA, NADAL et coll. 1964), greffe tumorale (BEATON, SELBY, 1961 - BOFFA, FINE et coll. 1962), excitation du S. R. E. (NICOL, CORDINGLEY et coll., 1963).

Parmi les variations, la plus frappante est une forte $\alpha_2$ globulinémie accompagnée d'une augmentation moindre des globulines $\alpha_1$. Par contre à côté d'une diminution modérée des albumines on note un effondrement des gamma-globulines qui atteint parfois à la limite l'agammaglobulinémie. Signalons que dans certains états normaux du Rat (périodes fœtales et néonatales), les macroglobulines $\alpha_1$ et $\alpha_2$ sont retrouvés en quantité importante dans le sérum (BOFFA, FINE et coll., 1956 - BOFFA, JACQUOT-ARMAND et coll., 1965).

Nous avons tenté de reproduire de telles modifications chez le Rat en créant un processus inflammatoire local qui excite le S. R. E.

Pour arriver à ce but bien des produits sont susceptibles d'agir tels que : formol, Kaolin, coton, éponge, carragénine, etc... (MARCY, 1961).

Parmi toutes ces techniques nous avons choisi la méthode qui consiste à créer un oedème à l'aide de la carragénine injectée dans une poche d'air (BORIS, STEVENSON, 1965).

En effet, ce procédé présente les avantages suivants :

- inflammation locale durable qui rend possible les modifications des protéines sériques,

- développement d'une cavité bien localisée et fermée dans laquelle on pourra injecter ultérieurement de l'or colloïdal,

- formation d'un exsudat abondant facilement prélevable.

Nous avons évité l'installation de cancers expérimentaux parce que leur évolution est trop rapide chez le Rat et ne nous aurait pas permis l'obtention en quantité appréciable de liquides d'épanchement (*).

- Principe

Après apparition du processus inflammatoire on prélève le sang et analyse par électrophorèse des fractions sériques qui sont comparées à celles obtenues avec les sérums de rats témoins.

- Technique

Des rats mâles pesant de 125 à 150 grammes sont rasés sur la peau du dos après avoir été anesthésiés à l'éther. On injecte à ce niveau, par voie sous-cutanée et en direction de la région scapulaire, 25 ml d'air. Par la même aiguille on introduit alors une suspension de carragénine dans l'huile de sésame à la dose de 125 mg dans un ml. Ce mélange tiédi au bain-marie est préparé extemporanément. Vingt quatre heures après l'administration de l'agent inflammatoire l'excès d'air contenu dans la cavité est éliminé.

Lorsque la réaction inflammatoire est développée (après 5 à 7 jours) on prélève du sang par ponction cardiaque sur l'animal anesthésié par injection intrapéritonéale au Pentobarbital sodique à la dose de 40 mg/kg. Du sang est prélevé de la même manière chez les rats "témoins".

Après coagulation et rétraction du caillot le sérum est soumis au fractionnement électrophorétique sur cellogel.

Les pourcentages respectifs des diverses fractions sont déterminés de la façon habituelle (Chapitre IV).

- Résultats

Les résultats obtenus sont d'une interprétation délicate dans le cas des sérums de rats normaux. En effet, les fractions $\alpha_1$ et $\alpha_2$ globulines sont assez mal individualisées alors qu'elles le sont parfaitement après électrophorèse de sérums de rats porteurs d'un foyer inflammatoire local obtenu à l'aide de carragénine (fig. 30).

Après une étude comparative portant sur 12 sérums de rats normaux et 12 de rats en état inflammatoire, le Tableau XVIII montre chez ces derniers une légère diminution en pourcentage des albumines, des beta et gamma globulines qui n'a pas de valeur significative. Par contre il existe une augmentation significative ($P < 0,001$) des alpha globulines. En effet ces globulines représentent $23,8 \pm 2,9$ % des protéines dans les sérums de rats normaux contre $31,7 \pm 4,1$ % dans les sérums de rats soumis à nos traitements expérimentaux.

Il est difficile d'individualiser sur cellogel aussi bien que sur un autre support (CAMPBELL, KERNOT et coll., 1959) les $\alpha_1$ et $\alpha_2$ globulines d'un rat normal. On peut néanmoins affirmer que le taux des $\alpha_1$ globulines est plus fort que celui des $\alpha_2$ globulines, ce qu'ont démontré certains auteurs par d'autres techniques (ANSELME, TIGAUD et coll., 1954 - BISERTE, HAVEZ et coll., 1959).

Chez le rat porteur d'un foyer inflammatoire à la carragénine le taux des alpha globulines augmente de manière significative ($P < 0,001$).

## II - ETUDE DE LA LIAISON "*IN VIVO*" DE L'OR COLLOIDAL 198 AVEC LES PROTEINES SERIQUES DE RATS PORTEURS D'UN FOYER INFLAMMATOIRE LOCAL A LA CARRAGENINE

L'inflammation locale à la carragénine, chez le Rat, se traduit dans son sérum par une augmentation des alpha globulines et en particulier des $\alpha_2$ globulines nettement individualisées des $\alpha_1$ globulines après électrophorèse sur cellogel

On peut alors se demander si dans ces conditions le comportement des préparations d'or colloïdal $S_2$, $S_6$ et Amersham vis-à-vis des protéines sériques du Rat enflammé sera le même que celui qui est trouvé chez le Rat normal.

Les colloïdes $S_2$, $S_6$ ou Amersham sont injectés par voie intraveineuse chez des rats sains et des rats en état inflammatoire. Le sang est prélevé quelques minutes après l'injection ; le sérum recueilli est soumis au fractionnement électrophorétique sur cellogel.

---

(*) Nous remercions Monsieur le Professeur TUBIANA, Chef du Département des Radioisotopes de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif, pour ses conseils judicieux.

A B

Figure 30 - Fractionnement électrophorétique sur cellogel
A - d'un sérum de Rat normal
B - d'un sérum de Rat porteur d'un foyer inflammatoire à la carragénine.

Tableau XVIII

Fractionnement par électrophorèse sur cellogel de sérums de rats

| Sérum | Albumine | Globulines | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\alpha_1 + \alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| Rats "Normaux" | 43,4 | | | 27,4 | 16,6 | 12,6 |
| | 50,5 | | | 20,2 | 19,2 | 10,1 |
| | 44,1 | | | 21,6 | 21,6 | 12,2 |
| | 44,4 | | | 22,2 | 22,2 | 11,1 |
| | 46,8 | | | 23,4 | 21,8 | 7,8 |
| | 50 | | | 26,6 | 16,6 | 6,6 |
| | 43 | | | 27 | 21 | 8,3 |
| | 37,5 | | | 23,2 | 23,2 | 16 |
| | 35,7 | | | 28,5 | 22,4 | 14,3 |
| | 45,8 | | | 25 | 16,7 | 12,5 |
| | 55,5 | | | 21,2 | 21,2 | 2 |
| | 50 | | | 20,4 | 25,3 | 4 |
| Moyenne | 45,6 | | | 23,8 | 20,5 | 9,7 |
| Ecart type | ± 5,6 | | | ± 2,9 | ± 2,8 | ± 4,1 |
| Rats "Traités" | 30,6 | 20,4 | 14,3 | 34,7 | 20,4 | 14,3 |
| | 54,2 | 19,4 | 10,6 | 30 | 13,8 | 6,4 |
| | 52,3 | 15,9 | 9,3 | 25,2 | 15,9 | 6,5 |
| | 47,1 | 17,6 | 11,7 | 29,3 | 16,2 | 7,4 |
| | 42,8 | 19 | 14,3 | 33,3 | 16,7 | 7,1 |
| | 31,8 | 20,5 | 20,4 | 40,9 | 20,4 | 6,8 |
| | 45,8 | 16,6 | 8,3 | 24,9 | 16,6 | 12,5 |
| | 42,3 | 19,6 | 11,4 | 31 | 21,1 | 5,6 |
| | 43,3 | 25 | 5,4 | 30,4 | 20 | 6,6 |
| | 48 | 22 | 12 | 34 | 14 | 4 |
| | 39,5 | 18,6 | 13,9 | 32,5 | 20,9 | 6,9 |
| | 46,2 | 18,4 | 15,4 | 33,8 | 12,3 | 7,7 |
| Moyenne | 43,6 | 19,4 | 12,3 | 31,7 | 17,4 | 7,6 |
| Ecart type | ± 5,9 | | | ± 4,1 | ± 2,8 | ± 2,6 |

- Technique

Les rats "témoins" et ceux qui sont porteurs d'une inflammation locale à la carragénine (rats traités), pèsent 125 à 150 grammes. Ces animaux à jeun reçoivent, après anesthésie au pentobarbital sodique par voie intrapéritonéale à la dose de 40 mg/kg, une injection d'or colloïdal dans la veine du penis. Chacune des préparations radioactives ($S_2$, $S_6$, Amersham) est administrée à trois rats "témoins" et à trois rats "traités". Les doses injectées sont de 100 µg d'or ($S_2$ et $S_6$) ou de 600 µg d'or (Amersham) par 100 grammes de poids corporel.

Moins de trois minutes après l'injection le sang est prélevé par ponction cardiaque.

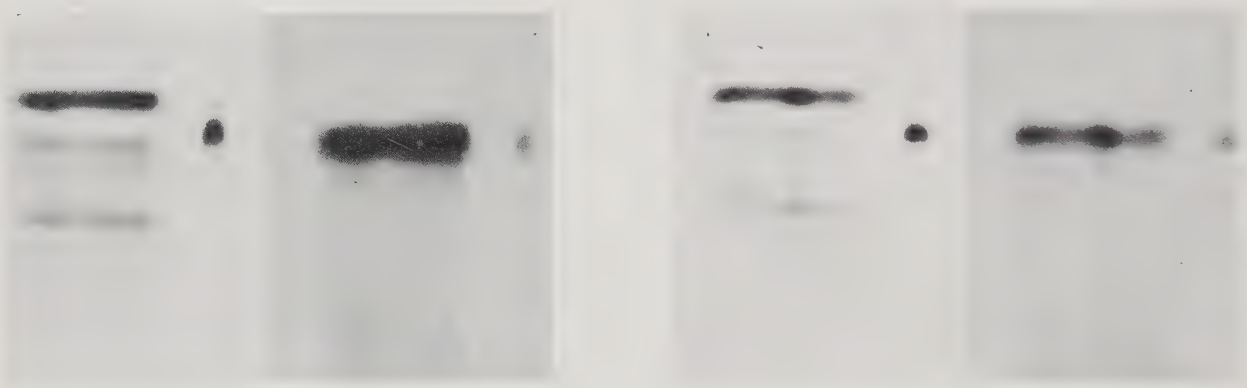
Le sérum radioactif, recuielli après coagulation, est déposé sur cellogel à raison de 100 microgrammes de protéines par dépôt. Sur la même bande on met à migrer dans les mêmes conditions un témoin de colloïde d'or 198 de même origine que celui contenu dans le sérum.

Les protéines et la radioactivité sont révélées le long des électrophorégrammes selon les méthodes décrites au Chapitre IV.

- Résultats

Les fractions $\alpha_1$ et $\alpha_2$, peu séparées après électrophorèse des sérums d'animaux sains, le sont nettement après électrophorèse des sérums de rats porteurs d'une inflammation locale à la carragénine.

Cependant les mobilités de ces fractions ne diffèrent pas et la localisation de la radioactivité le long des électrophorégrammes est identique dans les deux cas : le colloïde $S_2$ se situe au niveau des $\alpha_2$ globulines, les préparations $S_6$ et Amersham à celui des $\alpha_1$ globulines ; les colloïdes "témoins" présentent la même mobilité que lorsqu'ils sont mélangés au sérum. La figure 31 montre en A la migration de l'or colloïdal $S_6$, en B celle du colloïde Amersham seul ou mélangé *in vivo* au sérum de Rat enflammé. Les modifications qualitatives et quantitatives des protéines constatées dans les sérums de rats en état inflammatoire n'ont pas de répercussion sur le mode de liaison des particules colloïdales d'or 198 avec ces dernières. Les résultats sont en effet superposables à ceux que nous avons obtenus *in vitro* et *in vivo* avec les sérums de Rats sains.



A (polydispersé) B ($S_6$)

Figure 31 - Electrophorégrammes et autoradiographies correspondantes de sérum de Rats porteurs d'une inflammation locale, ayant reçu par voie intraveineuse :
A - 600 µg d'or Amersham
B - 160 µg d'or $S_6$ par kilo d'animal.

## III - COMPORTEMENT DE L'OR COLLOIDAL INJECTE DANS UNE CAVITE INFLAMMATOIRE EXPERIMENTALE

Des particules colloïdales introduites dans une cavité inflammatoire peuvent avoir un comportement varié. Elles sont susceptibles d'une part de quitter la cavité, d'autre part d'entrer en contact avec les éléments exsudatifs, c'est-à-dire les protéines et les macrophages du S. R. E.

Nous nous proposons ici d'étudier ces deux éventualités.

A - Diffusion de l'or à partir de la cavité

Dans un premier temps le colloïde passe du liquide exsudatif dans le sang. Il est ensuite capté par les organes riches en S. R. E.

Après administration des préparations radioactives dans la poche exsudative du Rat, on prélève à des temps variés un échantillon de sang, l'exsudat et la paroi de la cavité. La radioactivité de chaque prélèvement est déterminée par comptage au scintillateur à cristal creux.

- Technique

Les solutions colloïdales $S_2$ ou $S_6$ sont injectées sous un volume de 0,25 ml (1 à 2,6 mCi) dans des cavités inflammatoires provoquées à l'aide de carragénine. On prélève les échantillons 3, 6, 24 et 48 heures à raison de 3 rats par temps après injection du colloïde sur les animaux anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (40 mg/kg). Le sang est recueilli par ponction cardiaque ; l'exsudat est prélevé par ponction intracavitaire ; la poche exsudative est disséquée et lavée à l'aide de soluté de chlorure de sodium à 9 ‰ afin de chasser le reste d'exsudat. Les parois cavitaires sont dissoutes au bain marie dans une solution d'hydroxyde de sodium à 20 %.

La radioactivité de chaque échantillon est comptée au scintillateur à cristal creux après dilution dans l'eau pour éviter les pertes au comptage lorsque le taux de désintégrations est trop élevé.

- Résultats

Après incision de la peau du dos on constate que la poche qui adhère peu au tissu conjonctif sous-cutané est facilement détachée (fig. 32). Le liquide exsudatif qu'elle renferme a un volume variable compris entre 4 et 10 ml.

Après ouverture, la poche présente une paroi interne, tapissé de vaisseaux, recouverte d'une fine pellicule rougeâtre à laquelle adhère un granulome central fortement vascularisé (fig. 33).

Les chiffres, qui donnent le nombre de désintégrations par minute par gramme de tissu prélevé, permettent de représenter graphiquement le devenir biologique de l'or colloïdal radioactif au cours du temps après son injection dans une cavité inflammatoire locale (fig. 34). Les phénomènes observés sont identiques pour les colloïdes $S_2$ et $S_6$. La droite A représente le passage de l'or 198 dans le sang ; la droite B le dépôt des grains radioactifs sur les parois de la cavité qui confirme nos observations macroscopiques ; la droite C la radioactivité de l'exsudat. On constate que le passage de l'or 198 dans la circulation sanguine à partir de la cavité augmente au cours du temps. Néanmoins, la radioactivité sanguine par rapport à celle du liquide exsudatif ou des séreuses péricavitaires est minime. Elle ne peut de ce fait être localisée sur les protéines sériques par électrophorèse.

Dans l'exsudat la concentration radioactive est importante ; elle diminue peu à peu au cours du temps. Sur les parois cavitaires on observe un phénomène inverse en conservant une radioactivité bien inférieure à celle de l'exsudat.

En résumé, s'il existe un faible passage de l'or de la cavité dans le sang la majeure partie du colloïde reste dans le liquide exsudatif ou se fixe sur les parois de la cavité inflammatoire.

B - Etude de la liaison des particules colloïdales d'or 198 avec les protéines de l'exsudat

Comme le colloïde reste dans les cavités expérimentales inflammatoires du Rat il nous a paru intéressant de savoir si les particules d'or contractaient des liaisons avec les protéines de l'exsudat.

- Technique

Trois à quarante huit heures après injection d'or colloïdal $S_2$ ou $S_6$ dans les cavités inflammatoires les exsudats sont prélevés puis fractionnés par électrophorèse sur cellogel ou chromatographie selon les techniques décrites au Chapitre IV.

- Résultats

Les fractions protéiniques des exsudats présentent la même mobilité que celles du sérum quelle que soit la période du prélèvement. Le front de migration de l'or colloïdal $S_2$ est localisé au niveau des $\alpha_2$ globulines, celui des préparations $S_6$ est retrouvé avec les $\alpha_1$ globulines (fig. 35).

Toutefois d'un animal à l'autre on observe la présence de traînées plus ou moins importantes qui sont peut être le signe d'une dégradation du colloïde, ou l'effet d'un reste d'huile d'oeillette et

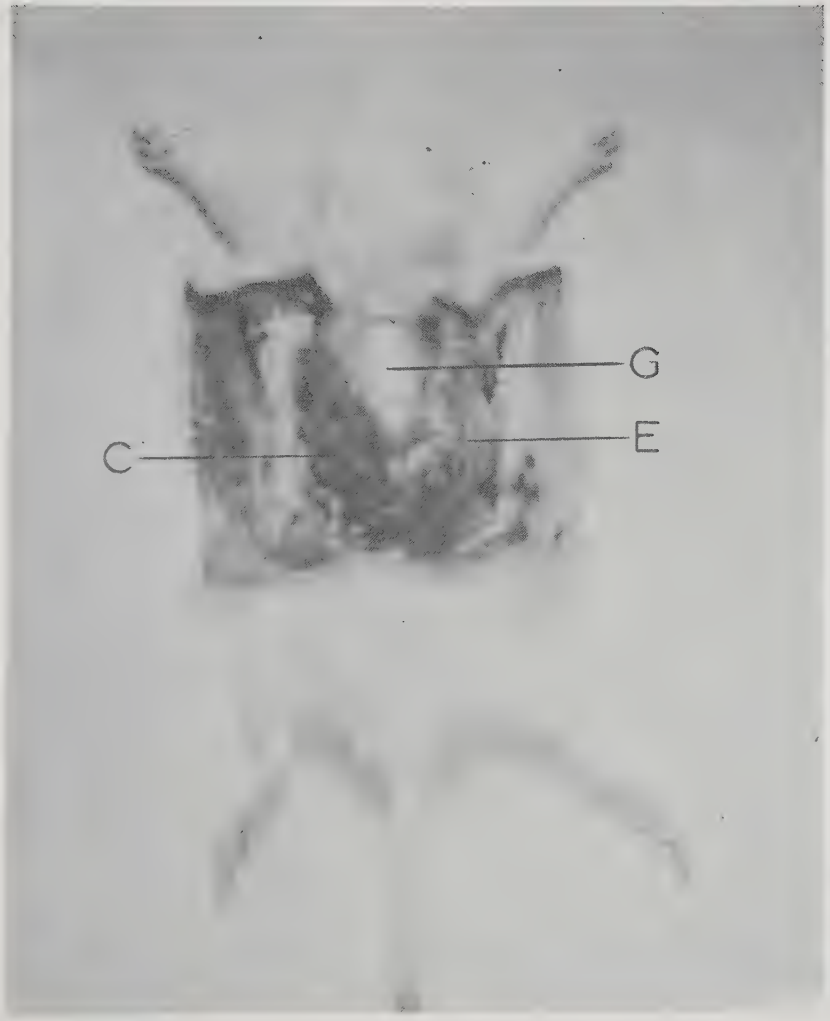



Figure 32 - Inflammation locale à la carragénine chez le Rat (technique BORIS, STEVENSON, 1965)
G : Granulome proprement dit,
E : Exsudat contenu dans la cavité
C : Cavité inflammatoire.

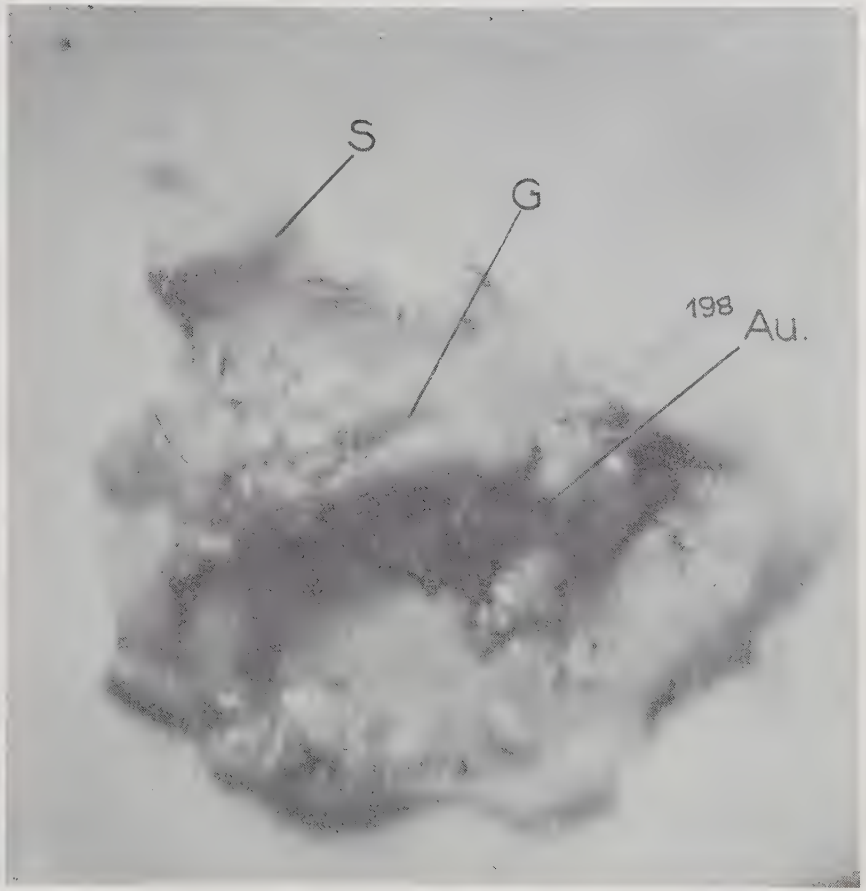



Figure 33 - Cavité inflammatoire ayant reçu de l'or colloïdal 198 $S_2$
S : Séreuse,
G : Granulome proprement dit,
$^{198}$Au : Dépôt du colloïde l'or sur la paroi de la cavité.

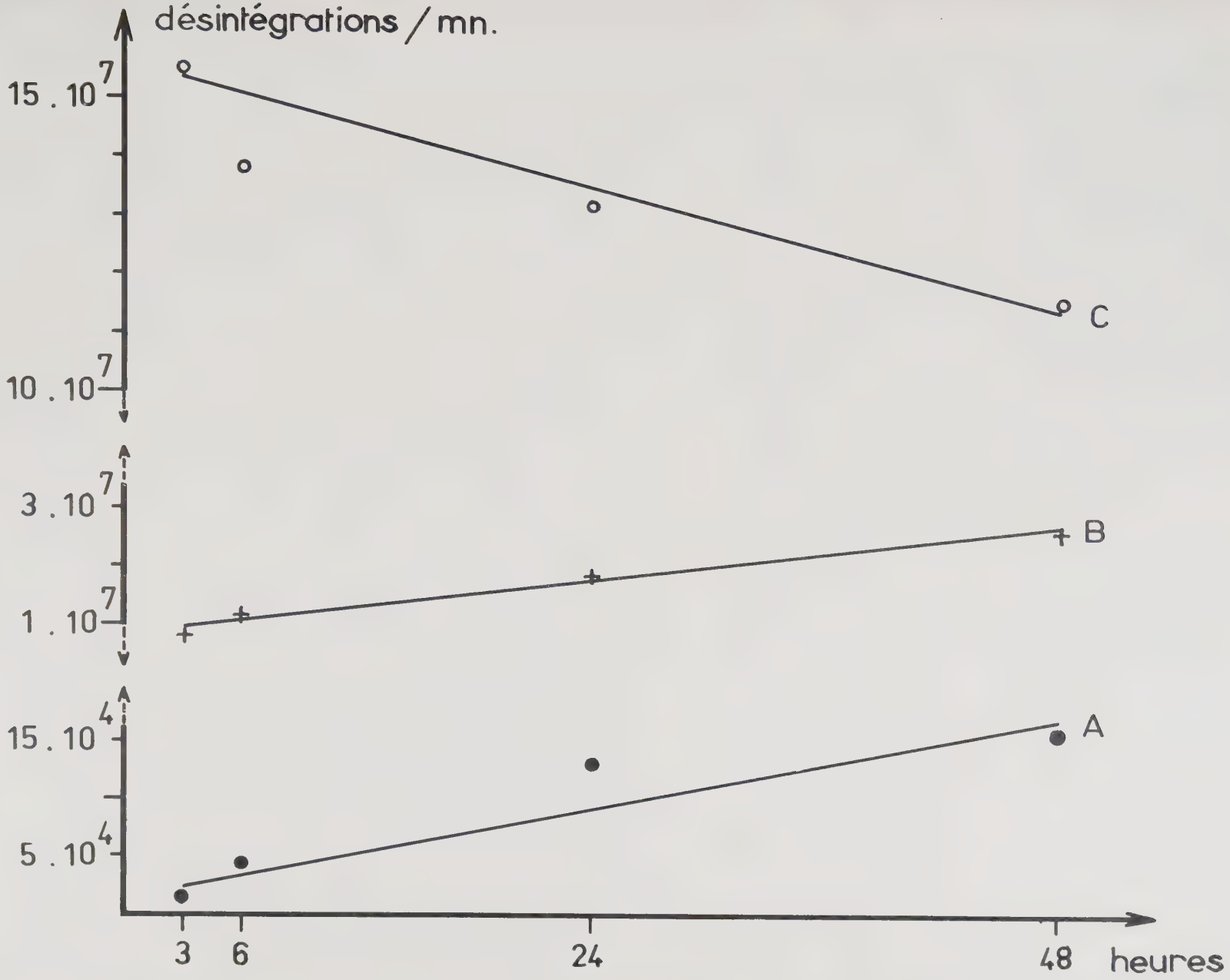
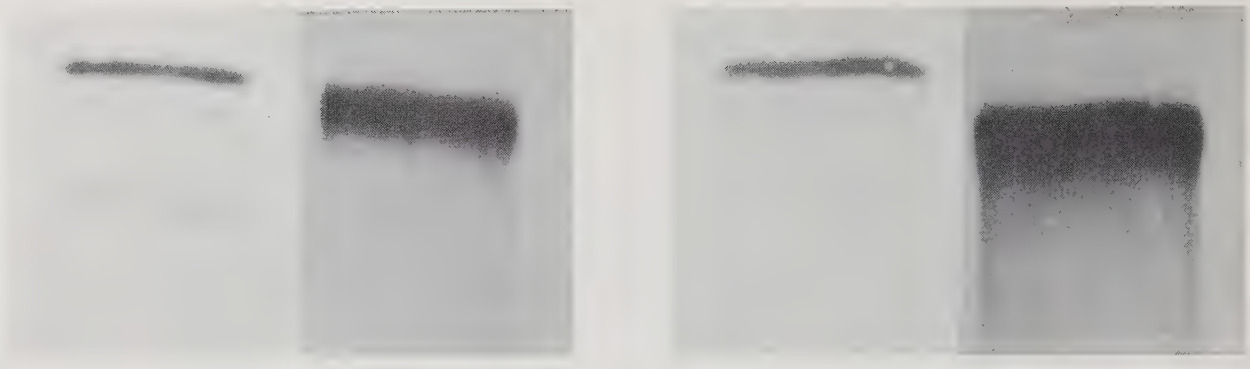



Figure 34 - Comportement biologique des colloïde d'or 198
A - dans le sang ; B - sur les parois ; C - dans l'exsudat, après administration dans une cavité inflammatoire expérimentale.



A B

Figure 35 - Electrophorégrammes et autoradiographies correspondantes d'exsudats mélangés "*in vivo*" au colloïde A ($S_6$) et au colloïde B ($S_2$).

de carragénine. De plus, dans certains cas une radioactivité non négligeable est retrouvée au niveau des albumines.

Après chromatographie sur gel de séphadex G 200 de l'exsudat prélevé dans une cavité qui a reçu de l'or $S_6$, une partie de la radioactivité est filtrée dans les premières fractions de l'éluat qui sont dépourvues de protéines, l'autre partie de l'or est retrouvée avec les protéines exsudatives. L'électrophorèse du lyophilisat et l'autogadiographie correspondante montrent que la radioactivité se localise au niveau des $\alpha_1$ globulines.

- CONCLUSION

Un foyer inflammatoire local à la carragénine entraîne chez le Rat une augmentation significative des alpha globulines ($P < 0,001$).

Les différences qualitatives et quantitatives de ces protéines n'ont pas de répercussion sur le mode de liaison de ces dernières avec les particules colloïdales d'or 198. Celles-ci se comportent de façon identique aussi bien avec les protéines sériques et exsudatives d'un rat en état pathologique qu'avec le sérum d'un rat sain : les grosses particules ($S_2$) se fixent sur les $\alpha_2$ globulines, les petites particules ($S_6$ et Amersham) sur les $\alpha_1$ globulines.

La liaison or colloïdal 198-protéines est confirmée par la filtration du mélange sur gel de séphadex G 200 qui montre une fraction protéinique radioactive.

Après l'administration du colloïde radioactif dans la cavité inflammatoire, les protéines qui fixent l'or 198 sont peut être responsables du passage de ce dernier dans le sang. En effet, on constate après l'injection une légère radioactivité sanguine qui va en augmentant dans le temps. Cependant la majeure partie des grains colloïdaux restent dans la cavité en suspension dans le liquide exsudatif, libres ou liés aux protéines, ou colmatés sur les parois péricavitaires après capture par les éléments du S. R. E.

# DISCUSSION GÉNÉRALE

On désigne, sous le terme général d'or colloïdal, des préparations qui diffèrent les unes des autres par leur mode de préparation, la taille des particules dispersées et la composition de la solution aqueuse dispersante. Ce sont ces préparations, utilisées au cours de notre travail, qu'il nous a été nécessaire de bien définir et dont il a fallu s'assurer de la stabilité avant d'entreprendre toute étude biologique.

Dans un premier temps nous discutons des arguments chimiques qui peuvent nous laisser penser à l'intégrité du colloïde d'or employé.

Dans un deuxième temps nous reprenons les arguments biologiques qui autorisent à parler du transport des particules colloïdales dans le sang et les liquides d'épanchement au moyen, en partie au moins, d'une liaison avec les protéines sériques.

## I - ARGUMENTS CHIMIQUES

L'or colloïdal est insoluble ce qui justifie son emploi thérapeutique (CHEVALIER, 1963). Mais, par suite du mode de préparation, chaque solution contient de 0,01 à 2 % d'or soluble sous forme d'ions auriques de solvation que l'on met facilement en évidence par chromatographie (COHEN, 1959) et dont la liaison avec les particules colloïdales est rompue dans l'organisme animal.

Bien que possédant une grande stabilité, l'or colloïdal peut être dégradé sous l'influence de facteurs physico-chimiques qui conduisent à une précipitation ou à la libération d'or soluble. Un facteur souvent négligé est la dilution. A ce propos nous avons m ontré que si l'or colloïdal résiste à la floculation après dilution dans l'eau, il perd sa capacité de migrer par électrophorèse au delà d'un certain taux de dilution. Les particules perdent donc une partie de leurs charges puisqu'elles deviennent insensibles à un champ électrique. On peut penser qu'il y a une solubilisation de la gélatine dans l'eau et par suite la perte des charges et la disparition de la protection. Le colloïde est alors assimilable à un sol lyophobe susceptible d'être détérioré par les électrolytes du tampon utilisé en électrophorèse.

De plus, le comportement de l'or vis-à-vis des méthodes d'analyse peut être modifié. Nous avons vu que l'or colloïdal mélangé à de la gélatine, soumis à une migration électrophorétique, entraîne les molécules gélatineuses lorsqu'elles sont peu abondantes et au contraire est retenu par ces dernières lorsqu'elles sont prépondérantes.

Aussi pour pallier ce risque de détérioration et aborder une expérimentation biologique avec sécurité nous avons utilisé au cours de notre travail diverses préparations d'or colloïdal non diluées et avons évité autant que possible tout effet diluant préjudiciable au colloïde au cours de nos techniques d'études.

## II - ARGUMENTS BIOLOGIQUES

Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que le devenir biologique des radiocolloïdes d'or et en particulier leur localisation dans divers tissus est fonction du mode d'administration lequel conditionne le mode de transport. En effet, par injection intraveineuse les particules d'or 198 sont véhiculées par le sang dont elles sont épurées après captation par les éléments histiocytaires abondamment présents dans le foie, la rate et la moelle osseuse.

Par voie intracavitaire le colloïde est résorbé par les cavités saines, véhiculé par le sang, et retrouvé ultérieurement dans les éléments du S. R. E. Ce passage dans le sang est certes beaucoup moins net après administration du colloïde dans les cavités enflammées ; il y a fixation importante sur les parois péricavitaires après capture par les macrophages.

Lorsque la solution colloïdale est infiltrée dans les tissus sous cutanés la migration, comme dans le cas précédent, est faible ; elle se fait par voie lymphatique et l'or est retrouvé dans les ganglions proches du point d'inoculation et en petite quantité dans le foie.

Toutes ces études montrent que le fait essentiel est la capture des particules colloïdales par les éléments du S. R. E., à contition que leur taille soit comprise entre 3 et 80 mμ (BIOZZI, 1965).

Pour nous le problème était de savoir comment le colloïde d'or se rend du point d'inoculation au point de fixation en nous limitant à la circulation sanguine et aux liquides d'épanchement.

Peu de travaux ont été consacrés à cette question, ils visent principalement le transport de l'or colloïdal par les protéines plasmatiques.

Ainsi par électrophorèse, la radioactivité étant détectée par autoradiographie, SIMON (1954) a mis en évidence une liaison des particules colloïdales, mélangées *in vitro* et *in vivo* à du sérum humain, avec les $\alpha$ et les $\beta$ globulines. MURRAY (1956), par la même méthode reconnaît une liaison sur les seules $\alpha_2$ globulines.

Enfin, d'autres auteurs retrouvent une localisation de $^{198}Au$ non seulement au niveau des globulines $\alpha$ mais aussi au niveau des albumines. Ainsi BELLION, GHEMI et coll. (1957), après injection intrapéritonéale d'or colloïdal chez l'Homme cancéreux, montrent que l'or 198 se fixe sur les albumines et les $\alpha_1$ globulines.

Devant l'incohérence des résultats il nous a semblé indispensable de préciser les caractéristiques des préparations d'or colloïdal d'origine différente et d'analyser leur transport par le sang.

A - Transport par le sang

1/ Mise en évidence d'un transport plasmatique

Après addition au sang "*in vitro*" ou "*in vivo*" des différents colloïdes d'or $S_2$, $S_6$ ou Amersham, la centrifugation du mélange sépare trois fractions sanguines : hématies, leucocytes et plasma. Les autoradiographies des coupes de culots sanguins prouvent que la radioactivité se trouve concentrée dans le plasma et surtout dans la fraction leucocytaire qui contient les éléments circulants du S. R. E. Les hématies sont dépourvues de radioactivité. Il nous paraît alors utile de discuter de l'importance relative des constituants sanguins dans le transport de l'or colloïdal compte tenu de ses caractéristiques physico-chimiques.

*- Rôle des hématies*

Par notre méthode nous ne détectons aucune radioactivité dans les hématies quelle que soit l'origine de la préparation envisagée, ceci confirme les observations de MAUPIN (1958) et GIORDANO (1962). Par contre les résultats opposés ont été trouvés par GALLE, RAYNAL et coll. (1965) qui montrent après centrifugation que les hématies renferment 1/5 de la radioactivité de l'échantillon sanguin. Cette divergence peut être expliquée de plusieurs manières :

- Les hématies prélevées pouvaient contenir une fraction des leucocytes qui, nous le verrons, concentrent la radioactivité.

- Il a pu également se produire une coagulation partielle et les microcaillots de fibrine auront entraîné les particules colloïdales au sein de la fraction globulaire. Nous avons parfois observé nous même ce phénomène lorsque la dose d'anticoagulant utilisée (héparine) était insuffisante.

*- Rôle des leucocytes*

Ainsi que l'ont constaté MAUPIN et LOVERDO (1958), les leucocytes, qui renferment les éléments mobiles du S. R. E., ont une grande affinité pour le colloïde aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

La fixation dans les leucocytes correspond sans doute à une capture des particules par colloïdopexie, réalisée par les cellules aptes à la phagocytose. Ce phénomène, ainsi que l'a montré GOSSELIN (1956) avec des macrophages isolés de la cavité péritonéale de Lapin, s'effectuerait en deux phases :

- d'abord une fixation réversible brève sur l'extérieur de la membrane cellulaire,

- ensuite un passage irréversible dans la cellule.

Seule la première phase répond à la définition du transport que nous avons donnée : liaison labile qui permet l'acheminement d'une substance de son point d'inoculation jusqu'à son site d'action ou de stockage (COHEN, WEPIERRE et coll., 1965). Dans la deuxième phase la liaison définitive ne permet plus d'attribuer aux leucocytes un rôle dans le transport. De ce fait c'est surtout le plasma qui paraît être le véritable véhicule de l'or colloïdal.

*In vitro* la concentration radioactive dans le plasma reste importante car les éléments leucocytaires sont rapidement saturés par le colloïde. Ce phénomène est observé après mélange des colloïdes à petites aussi bien qu'à grosses particules. Par contre *in vivo* la colloïdopexie, qui est le fait non seulement des leucocytes mais des éléments fixes du S.R.E., ce qui explique la rapide disparition de la radioactivité plasmatique, semble différente selon qu'il s'agisse du colloïde $S_2$ ou du colloïde $S_6$. En effet l'or colloïdal à petites particules est éliminé de façon plus rapide que ne l'est le colloïde $S_2$ à grosses particules puisqu'il disparaît du plasma dès la troisième minute. Ce fait montre que l'intensité colloïdopexique est influencée par les caractéristiques physico-chimiques du colloïde injecté.

*- Rôle du plasma*

Bien que l'or colloïdal ait *in vivo* une courte demi-vie biologique dans le plasma, on peut dire qu'il est transporté par cette fraction sanguine ; en effet, elle assure par une liaison labile, ou sans liaison, le déplacement de l'or colloïdal dans les diverses parties de l'organisme.

Parmi tous les éléments du sérum, les protéines sont les plus aptes à assurer le transport.

2/ Mise en évidence d'une liaison aux protéines (Séphadex)

Nous avons cherché à savoir si les particules radioactives présentes dans le plasma y demeuraient libres ou si au contraire elles étaient liées d'une façon plus ou moins labile aux protéines sériques. Pour ce faire nous avons soumis les mélanges à une filtration sur gel de séphadex G 200. Les résultats obtenus montrent un comportement identique quelle que soit la taille des grains d'or colloïdal utilisée : nous séparons d'abord de l'or libre puis de l'or associé avec les protéines dans des proportions qui dépendent de la quantité de colloïde mise en présence du sérum. Grossièrement la proportion d'or retenue semble inversement proportionnelle à la quantité de colloïde mise en présence des protéines.

Notre travail lève l'objection suivant laquelle la liaison de l'or 198 aux protéines est due à la dénaturation du colloïde radioactif ou à l'or ionique présent dans toute préparation. En effet si l'on lyophilise la partie protéinique radioactive et que l'on soumette ce lyophilisat, remis en solution aqueuse, à un fractionnement électrophorétique, on retrouve la radioactivité à un niveau qui correspond à celui d'un colloïde intégre, c'est-à-dire au niveau des $\alpha_1$ globulines, avec le colloïde $S_6$, au niveau des $\alpha_2$ globulines avec le colloïde $S_2$. Ces faits montrent de plus qu'il ne peut s'agir de l'or ionique puisque ce dernier se fixe sur les albumines.

On peut donc admettre que les protéines sériques retiennent des grains d'or colloïdaux.

Si nous avons pu facilement mettre en évidence cette rétention de l'or 198 par les protéines du sérum en général, en appliquant au mélange une chromatographie sur colonne de séphadex G 200, il nous est impossible par cette méthode de différencier le comportement des divers colloïdes en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. De plus, nous ne connaissons pas la fraction sérique responsable de cette fixation. Pour ce faire nous avons utilisé deux techniques de fractionnement par électrophorèse, une sur papier, l'autre sur cellogel.

3/ Mise en évidence d'une liaison avec les $\alpha_1$ et $\alpha_2$ globulines (électrophorèse)

La radioactivité retrouvée dans le plasma peut provenir de l'or colloïdal mais également des ions chlorauriques de solvatation que nous appelons or ionique. Nous envisagerons donc la fixation de ce dernier sur les protéines avant d'aborder le sort du colloïde.

*- Liaison de l'or ionique*

Divers auteurs ont étudié la répartition de l'or ionique sur les protéines sériques humaines (GALLE, RAYNAL et coll., 1965) ou de Lapin (EKHOLM, 1951) par électrophorèse. La détection de la radioactivité permet de localiser l'or 198 au niveau des albumines. Nous avons complété cette étude en analysant la fixation en fonction de la dose d'or ionique ajoutée au sérum. Nous avons

montré qu'aux faibles doses seules les albumines sont radioactives, par contre, en augmentant les doses, $\alpha$ et $\beta$ globulines captent le métal qui ne présente pas d'affinité pour les $\gamma$ globulines. On a donc une saturation progressive des diverses fractions protéiniques semblable à celle qui est rencontrée avec le chrome 51 (COHEN, WEPIERRE et coll., 1965).

Cette localisation de l'or ionique explique qu'après injection intrapéritonéale d'or colloïdal on retrouve de la radioactivité sur les albumines (BELLION, GHEMI et coll., 1957 - GALLE, RAYNAL et coll., 1965) ainsi que nous l'avons nous même constaté en prolongeant le contact des électrophorèses avec les films ou sur les prélèvements tardifs chez des animaux ayant reçu des injections d'or colloïdal.

Dans les conditions que nous avons adoptées pour l'étude de la fixation de l'or colloïdal sur les protéines on peut penser que l'or ionique, peu abondant dans ces préparations, ne se fixera que sur les albumines.

*- Liaison de l'or colloïdal*

Alors que dans le cas de l'or ionique on observe une liaison or-protéine, ce phénomène ne peut se reproduire pour l'or colloïdal qui est un colloïde protégé par une couche de gélatine. La nature de la liaison est donc spéciale, la seule qui puisse se réaliser est une liaison protéine-gélatine à moins que les protéines ne déplacent la gélatine pour occuper ses sites de fixation. Il semble que cette dernière hypothèse soit à éliminer. En effet, BONTOUX (1961) a étudié l'interaction des protéines avec la gélatine et montre par analyse de la diffusion lumineuse que ce sont surtout les $\alpha$ et $\beta$ globulines qui forment avec cette dernière, dans les conditions expérimentales choisies, un complexe soluble. Les $\gamma$ globulines et les albumines ne contractent aucune liaison.

D'autre part, SIMON (1954) a montré que l'or colloïdal migrait avec les $\alpha$ et $\beta$ globulines.

Ces similitudes de fixation font donc penser à une liaison gélatine-protéines.

Enfin, il semble que la gélatine entretienne avec la micelle d'or des liaisons assez solides puisqu'elle est capable de freiner la migration électrophorétique des particules colloïdales dans certaines conditions. Il ressort de tout ceci que les liaisons intéresseront la particule dans son entité, telle que nous l'avons décrite précédemment.

Les mélanges *in vitro* et *in vivo* de sérums humains ou d'animaux sains avec les colloïde $S_2$, $S_6$ ou Amersham montrent après fractionnement électrophorétique que la radioactivité migre comme celle de l'or colloidal déposé seul c'est-à-dire au niveau des alpha globulines : les grosses particules ($S_2$), se localisent sur les $\alpha_2$ globulines, les petites particules ($S_6$ et Amersham) sur les $\alpha_1$ globulines.

Pourtant les données de la littérature sont discordantes sur le rôle de fixation joué par telle ou telle fraction protéinique. Nous avons tenté de chercher les causes qui pourraient expliquer cette divergence dans les résultats, à savoir :

1/ la taille des particules,

2/ la dose d'or mise en présence des protéines,

3/ la nature des protéines (utilisation d'espèces animales différentes saines),

4/ les méthodes de caractérisation de la liaison.

1/ Taille des particules

S'il est impossible par filtration sur séphadex de séparer les "or" selon leurs origines, on note par électrophorèse une migration variable selon la taille des particules. Ces différences expliquent en partie les divergences de la bibliographie où les auteurs n'indiquent pas toujours l'origine de leur colloïde. Lorsque cette précision est donnée nous retrouvons des résultats concordants ; en effet GIORDANO (1962) retrouve l'or colloïdal Amersham au niveau des $\alpha_1$ globulines du Lapin.

L'or seul ou l'or mis en présence de protéines sériques migre exactement à la même vitesse, ce qui montre une coïncidence du lieu de migration de l'or colloïdal libre et de la protéine fixatrice. Mais dans ce cas on s'explique mal pourquoi des particules qui ne diffèrent que par leur taille auraient une vitesse de migration différente : migration avec les $\alpha_2$ globulines dans le cas des grosses particules, migration avec les $\alpha_1$ globulines dans le cas des petites particules.

2/ Dose de colloïde mise en présence des protéines sériques

Divers auteurs ont montré une affinité variable de divers composés tels que le chrome trivalent (COHEN, WEPIERRE et coll., 1965) pour les protéines en fonction de leurs doses respectives. Nous même avons rapporté que l'or ionique se fixait sur les albumines aux faibles doses puis sur les autres fractions pour des quantités d'or plus élevées.

Dans le cas de l'or colloïdal des traînées importantes qui pouvaient faire penser à une telle fixation ont été mises en évidence par électrophorèse sur papier de sérum incubé avec une forte proportion d'or. Mais du fait que ces traînées sont entièrement réductibles sur un support de cellogel on peut dire que les particules migrent toujours à la même vitesse quelle que soit la dose d'or mise en présence de sérum sanguin. Ces résultats ne permettent donc pas à eux seuls de prouver une liaison des protéines avec l'or colloïdal par électrophorèse.

3/ Nature des protéines

Nous avons mis l'or en présence de protéines variées en utilisant des sérums qui présentent des fractions différentes tant en qualité qu'en quantité.

En présence des protéines normales de l'Homme, du Rat, du Cobaye ou du Lapin l'or colloïdal a toujours conservé la même vitesse de migration.

Si ces expériences n'apportent ici encore aucune preuve du transport de l'or colloïdal par les protéines, elles montrent que les discordances des résultats des travaux antérieurs ne sont pas attribuables aux espèces animales utilisées (Lapin : GIORDANO, RINALDIS et coll., 1962 - Rat : MURRAY, 1956) mais dues aux caractéristiques physico-chimiques des colloïdes d'or.

4/ Caractérisation de la liaison

L'électrophorèse est la technique utilisée par de nombreux auteurs ; ce mode d'étude, nous l'avons vu, ne permet pourtant pas de prouver une liaison. Néanmoins il faut signaler que sur papier la traînée très importante laissée par l'or seul au cours de sa migration est atténuée lorsqu'il est mélangé au sérum : le colloïde serait entraîné par les protéines.

MURRAY (1956) constate un phénomène identique puisque l'or colloïdal dilué dans le sérum physiologique reste au lieu de dépôt alors qu'il migre au niveau des $\alpha_2$ globulines après mélange avec du sérum. Toutefois l'absence de déplacement de l'or seul est, selon nous, la conséquence d'une dénaturation du colloïde provoquée par la dilution aqueuse excessive.

B - Transport par les liquides d'épanchement

La question du transport de l'or colloïdal se pose encore après administration de ce dernier dans les cavités soumises à un processus inflammatoire pathologique ou expérimental. En effet, l'or colloïdal est introduit couramment en thérapeutique anticancéreuse dans les cavités naturelles distendues par des liquides d'épanchement pathologique. Il convient alors de savoir si les grains colloïdaux d'or 198 restent libres au sein de ces humeurs ou s'ils se fixent sur telle ou telle protéine. Dans ce cas nos études se sont arrêtées à des expériences "*in vitro*" sur des liquides ascitiques et pleuraux.

Par contre chez l'animal nous avons provoqué des cavités inflammatoires locales à la carragénine et nous avons suivi *in vivo* le comportement biologique de l'or colloïdal après son administration au sein du liquide d'épanchement.

1/ Expériences "*in vitro*"

Les colloïdes d'or, mélangés *in vitro* aux protéines contenues dans les liquides d'origine néoplasique sont retrouvés selon la taille de leurs particules avec les $\alpha_1$ ou les $\alpha_2$ globulines après fractionnement par électrophorèse. Comme lors de nos études sur les mélanges de sérum humain normal avec les préparations d'or colloïdal 198, les résultats laissent penser que les colloïdes sont liés aux protéines des liquides d'épanchement cancéreux. Cependant un doute subsiste sur l'existence de cette liaison puisque l'or seul ou l'or mis en présence de protéines migre exactement à la même vitesse. La technique de fractionnement par électrophorèse n'est toujours pas suffisante pour apporter la preuve d'une liaison, il faut y associer une autre méthode que nous avons choisie être la filtration exclusion sur gel de séphadex et que nous avons appliquée aux mélanges réalisés *in vivo*.

2/ Expériences "*in vivo*"

Ainsi après chromatographie d'exsudat prélevé chez le rat dans une cavité expérimentale qui a reçu de l'or $S_6$, une partie de la radioactivité est filtrée dans les premières fractions de l'éluat qui sont dépourvues de protéines, l'autre partie de l'or est retrouvée avec les protéines exsudatives. Cette dernière portion, lyophilisée et soumise au fractionnement électrophorétique, montre une zone radioactive au niveau des $\alpha_1$ globulines.

Après administration de colloïde $S_2$ on retrouve l'or 198 au niveau des $\alpha_2$ globulines ; on constate donc par chromatographie que l'or colloïdal se fixe bien sur les protéines, et par électrophorèse que la migration du colloïde radioactif est conditionnée par ses caractéristiques physico-chimiques, c'est-à-dire les grosses particules ($S_2$) avec les $\alpha_2$ globulines, les petites particules ($S_6$ et Amersham) avec les $\alpha_1$ globulines.

D'autre part nous avons montré que l'or colloïdal 198 introduit dans une cavité expérimentale restait au sein du liquide d'épanchement ou adsorbé sur les parois ; une portion minime de radioactivité est cependant retrouvée dans le sang. Il nous est impossible dans le cadre de nos recherches de préciser s'il s'agit d'or ionique ou d'or colloïdal. De toutes façons, il paraît probable que les protéines ont un rôle à jouer pour permettre le passage de l'or dans la circulation sanguine à partir de la cavité.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion l'or colloidal semble contracter avec les protéines une liaison faible susceptible d'assurer un transport dans les liquides circulants. Cette liaison est mise en évidence par filtration sur gel de séphadex et confirmée, au moins en partie, par électrophorèse.

Ces caractères de fixation sur les protéines sont retrouvés après incubation *in vitro* avec les protides sains ou pathologiques (liquide d'ascite, liquide pleural), et *in vivo* chez des animaux sains (Lapin, Rat, Cobaye) ou des rats porteurs d'une inflammation locale à la carragénine.

# BIBLIOGRAPHIE


(1) ADLER H., REIMANN F. - Beitrag zur Funktionsprüfung des Reticulo endothelial Apparates.
Z. ges exper. Med., Dtsch.
1925, *47*, 617-633.

(2) ADLERCREUTZ E., PETTERSSON T. - Reticuloendothelial system and anticoagulant therapy. Studies with radioactive colloïdal gold.
Lancet, G. B.
1963, *7279*, 470-1.

(3) AGNERAY J., WEPIERRE J., PUISIEUX F. - Décoloration automatique des protéinogrammes sans distillation. Etude des causes d'erreurs.
Annales de Biologie Clinique.
1959, 3-4, 1-7.

(4) ALEXANDER J. - Colloid chemistry, principles and applications.
Von Nostrand Co, New-York.
1937.

(5) ALLEN W.M., SHERMAN A.I., ARNESON A.N. - Carcinoma of the cervix : results obtained from the irradiation of the parametrium with radioactive colloidal gold.
Am. j. obst. and gynec.
1954, *68*, 1433-1446.

(6) ANSELME J., TIGAUD J., LAMBERT R., COTTET J. - Recherches électrophorétiques sur les protéines du sérum de rats. Etude statistique des resultats.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Fr).
1954, *36*, 1599-1609.

(7) ARONSSON T., GRONWALL A. - Improved separation of serum proteins in paper électrophoresis. A new electrophoresis buffer.
Scand. J. Clin. Lab. Invest.
1957, *9*, 338-341.

(8) ASCHOFF K. - Reticulo-endothelial system.
Ergeb. inn. Med. u. Kinderheïlk.
1924, *26*.

(9) AUDUBERT R. - Des précipités colloïdaux aux macromolécules.
Presses Universitaires de France.
1956.

(10) AUDUBERT R. et de MEND S. - Les principes de l'électrophorèse.
Presses Universitaires de France.
1957.

(11) BACKER J. de, PAHAUT J. - Symposium de Physique et de Technologie. Rapport sur les applications médicales des matières colloïdales radioactives.
J. Belge radiol.
1957, *40*, 1-107.

(12) BAILLIF R.N. - Reaction patterns of the reticulo-endothelial system under stimulation.
in : The reticulo-endothelial system.
Ann. New-York Acad. Sci.
1960, *88*, 1.

(13) BARGMANN W. - Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
G. Thieme Ed. Stuttgart.
1956.

(14) BEATON G. H., SELBY A. E., VEEN M. J., WRIGHT A. M. - Slow α2-globulin and other serum proteins in pregnant, tumo-bearing, and young rats.
J. Biol. Chem., U. S. A.
1961, *236*, 2 005-2 008

(15) BELLION B. - Caractéristiques physico-chimiques et propriétés biologiques des radiocolloïdes.
Minerva nucl., Ital.
1964, *8*, (2), 116-122.

(16) BELLION B., BUCHI G., CHIARLE S. - Etude de l'élimination par la cavité péritonéale, de préparation colloidales de diverses dimensions micellaires.
Minerva nucl., Ital.
1963, 7 (11), 454-459.

(17) BELLION B., GHEMI F., TURCO G. - Comportamento biologico della radioattivita iniettata nelle cavita sierose di pazienti affetti di carcinosi.
Minerva nucl., Ital.
1957, 155.

(18) BENACERRAF B., STIFFEL C., BIOZZI G., HALPERN B. N. - Mesure de l'activité granulopexique du S. R. E. à l'aide du saccharate d'oxyde de fer chez le Rat.
C. R. Soc. Biol., Fr.
1954, *48*, 486-490.

(19) BENHAMOU J. P. - Etude expérimentale et clinique de la granulopexie au moyen de l'or colloïdal radioactif. Application à la mesure du débit hépatique.
1957, Paris (Thèse Médecine).

(20) BENHOLD H., SEYBOLD G. - Der aufnahmemechanismus plasmaeiweissgebundener Vitalfarbstoffe in speichernde Zellsysteme.
Z. exper. med.
1952, *118*, 407-424.

(21) BERG H. F., CHRISTOPHERSON V. M. - Selective irradiation of lymph nodes by intersticial injection of radioactive colloidal gold.
J. amer. med. Ass.
1956, *161*, 6, 562-563.

(22) BILBEY D. L. J., NICOL T. - Effect of various natural steroids on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system.
Nature.
1958, *182*, 674.

(23) BILBEY D. L. T., NICOL T. - The molecular basis of drug effect on R. E. S. activity.
in : HALPERN B. N.
Rôle du S. R. E. dans l'immunité antibactérienne et antitumorale.
Colloques C. N. R. S. Gif/Yvette, 1962.

(24) BILLITTERI A., GASSO G., ROMEO S. - Mesure de l'activité granulopéxique du système histiocytaire à l'aide d'une suspension d'or colloïdal $^{198}Au$.
Radiobiologica Latina.
1962, 5, 4, 459-469.

(25) BILLITTERI A., ROMEO S., GASSO G. - Distribution, dans les tissus et dans les organes de quelques espèces animales, d'une suspension d'or colloïdal $^{198}Au$ administrée par voie intraveineuse.
Minerva nucl., Ital.
1963, 7, (12), 532-536.

(26) BIOZZI G. - Confrontation sur la Biologie des radiocolloïdes.
I. N. S. T. N.
Saclay 30 Mars 1965.

(27) BIOZZI G., BENACERRAF B., GRUMBACH F., HALPERN B.N., LEVADITI J., RIST N. - Etude de l'activité granulopexique du S.R.E. au cours de l'infection tuberculeuse expérimentale de la souris.
Ann. Inst. Pasteur, Paris.
1954, *87*, 291.

(28) BIOZZI G., BENACERRAF B., HALPERN B.N. - Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. A study of the kinetics of the granulopectic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity.
Brit. J. Exp. Path.
1953, *34*, 441-457.

(29) BIOZZI G., BENACERRAF B., HALPERN B.N. - The effect of salm. typhi and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in mice.
Brit. J. Exp. Path.
1955, *36*, 226-235.

(30) BIOZZI G., HALPERN B.N., BILBEY D., STIFFEL C., BENACERRAF B., MOUTON D. - Oestrogènes et fonction phagocytaire du système reticulo-endothélial (S.R.E.).
C.R. Soc. Biol., Fr.
1957, *151*, 1326-1331.

(31) BIOZZI G., HALPERN B.N., STIFFEL C. - Stimulation du S.R.E. par l'extrait microbien wxb 3148 et résistance aux injections expérimentales.
Coll. Intern. C.N.R.S. n° 115.
Juin 1962.

(32) BIOZZI G., STIFFEL C., HALPERN B.N., MOUTON D. - Effet de l'inoculation de bacille de Calmette-Guérin sur le développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la Souris.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1959, *153*, 987-989.

(33) BISERTE G., HAVEZ R., HAYEM-LEVY A., VANLERENBERGHE J., DRIESSENS J. - Etude électrophorétique des sérums de rats normaux et de rats porteurs de tumeurs greffées.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1959, *153*, 621-626.

(34) BOFFA G.A., FINE J.M., JACQUOT-ARMAND Y., GAUDIN-HARDING F., SUSBIELLE H. - Existence de macroglobulines $\alpha_1$ et $\alpha_2$ dans le sérum de rat au cours des périodes foetales et néo-natales.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1956, *159*, (6), 1342-1347.

(35) BOFFA G.A., FINE J.M., ZAJDELA F. - Dysprotéinémie de nature $\alpha_2$ globulinique chez le rat porteur d'hépatome greffé.
C.R. Acad. Sci., Fr.
1962, *255*, 802-804.

(36) BOFFA G.A., JACQUOT-ARMAND Y., GAUDIN-HARDING F., SUSBIELLE H., FINE J.M. - Etude de l'$\alpha_2$ macroglobuline sérique du rat. Mise en évidence au cours de la gestation.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1965, *159* (6), 1307-1312.

(37) BOFFA G.A., NADAL C., ZAJDELA F., FINE J.M. - Slow Alpha 2-Globulin of rat serum.
Nature.
1964, *203*, 1182-1184.

(38) BONTOUX J. - La gélatine dans l'or colloïdal radioactif.
Thèse (Sciences).
Université de Montpellier, France 1961.

(39) BONTOUX J. - Le système gélatine - or ionique.
Ann. Pharm. Fr.
1964, *22*, 8-9, 517-522.

(40) BONTOUX J. - Confrontation sur la biologie des radiocolloïdes.
I.N.S.T.N. Saclay 1965.
Circulaire DR/gcp/65-8295/YC/RA.

(41) BORIS A., STEVENSON R. H. - The effects of some non-steroidal anti-inflammatory agents on carrageenin induced exudate formation.
Arch. int. pharmacodyn.
1965, *153*, 1-2, 205-210.

(42) BOTSFORD T. W. - Experiences with radioactive colloïdal gold in the treatment of pleural effusion caused by metastatic cancer of the breast.
New-Engl. J. Med.
1964, *270*, (11), 552-555.

(43) BUCHI G., CHIARLE S., ROSA V., SOSI S. - Etude de l'effet de l'adjuvant de Freund sur la captation lymphonodale des colloïdes radioacatifs.
J. Radiol. Electrol. med. nucl., Fr.
1965, *46*, 5, 276-278.

(44) CAMPBELL P. N., KERNOT B. A., ROITT I. M. - A comparaison of the serum proteins of normal rats with those of rats bearing liver tumors.
Biochem. J., G. B.
1959, *71*, 155-159.

(45) CARO R. A., INGRAND J. - Détermination spectrophotométrique de la taille des particules d'or colloïdal radioactif.
Rev. opt. Théor. instrum., Fr.
1965, *44*, 6, 281-293.

(46) CAROLI J. - Première observation de tumeur primitive de la rate (réticulo-sarcome) diagnostiquée grâce au scintillogramme splénique l'or marqué.
Revue med. chirurg. foie.
1961, *36*, 1-8.

(47) CEIA M., CLODE W., SOBRAL J. M. - Electrophorèse du sérum et des épanchements chez les cancéreux (étude comparée).
Gazeta media Portuguesa.
1960, vol XIII, n° 5, 626-636.

(48) CHARLOT G., BEZIER D. - Spectrophotométrie par absorbtion ou colorimétrie p. 219-236.
in : Analyse quantitative minérale.
Masson et Cie, Paris 1955.

(49) CHEVALLIER A. - Remarques préliminaires à l'étude des colloïdes radioactifs.
Minerva Nucl., Ital.
1963, 7 (11), 439-441.

(50) CHEVALLIER A., BURG A. - sur une technique de mesure de la migration des granules colloïdaux radioactifs dans le système lymphatique, après injection locale.
Radioisotopes in scientific research, par R. C. EXTERMAN (vol. 3).
Pergamon press. London.
1958.

(51) CHEVREMONT M. - Les éléments du muscle squelettique cultivé *in vitro* ; leur transformation en histiocytes.
C. R. Soc. Biol.
1939, *132*, 487-490.

(52) CHEVREMONT M., CHEVREMONT-COMHAIRE - Nouvelles recherches sur la déterminisme de la transformation histiocytaire dans les cultures de muscles squelettiques.
C. R. Soc. Biol.
1945, *139*, 48-51.

(53) COHEN Y. - Le contrôle des radioéléments artificiels à l'usage médical en France.
Ann. Pharm., Fr.
1959, *17*, 250-260.

(54) COHEN Y. - Bases expérimentales de l'emploi des colloïdes radioactifs en thérapeutique.
Prod. probl. pharm., Fr.
1961, *16*, 1-10.

(55) COHEN Y. - Une nouvelle classe de médicaments, les isotopes radioactifs.
Prod. probl. pharm., Fr.
1962, *17*, (1), 3-18.

(56) COHEN Y. - Méthodes biologiques d'essai des radiocolloïdes et leur valeur.
J. Radiol. Electrol. Med. Nucl., Fr.
1965, *46*, 5, 259-260.

(57) COHEN Y. - Communications personnelles.
1966.

(58) COHEN Y., COSTEROUSSE O., CHIVOT J.J. - Pharmacodynamie des colloïdes radioactifs.
Minerva nucl., Ital.
1964, *8* (6), 357-366.

(59) COHEN Y., DELASSUE H. - Modifications de la méthode d'autoradiographie de S. Ulberg sur coupes de souris entières.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1959, *153*, 2, 300-304.

(60) COHEN Y., WEPIERRE J., PONTY D. - Fixation du chrome 51 sur les fractions protéiques du sérum sanguin.
in :FELLINGER K., HÖFER R.
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung.
Band VI - Urban und schwarzemberg - Munchen 1965.

(61) COHEN Y., WEPIERRE J., ROUSSELET J.P. - Radioactive isotopes in investigating Transport phénomena by plasma proteins.
in : DESGREZ P. and TRAVERSE P.M.
Transport Function of Plasma Proteins.
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1966.

(62) COLLET A., POLICARD A. - Essai de localisation infrastructurale dans le poumon des éléments du S.R.E., p. 44 à 46.
in : Rôle du S.R.E. dans l'immunité antibactérienne et antitumorale.
Colloque C.N.R.S. Gif/Yvette, 1962.

(63) CONSTANT R., MAISIN J., VANDERLINDEN P., WAMBERSIE A. - L'or colloïdal radioactif ($^{198}$Au). Ses caractéristiques. Son devenir dans l'organisme humain.
J. Belge Radiol.
1960, *43*, 4, 493-412.

(64) COOPER J.A., BULKLEY G.J., O'CONOR V.J. - Intraprostatic injection or radioactive colloids. I/ Distribution and excretion following injection in the dog.
J. Urol.
1954, *71*, 624-627.

(65) DELABARRE F. - Généralités sur la biochimie du système réticulo-endothélial.
in : POLONOVSKI M. Pathologie chimique.
Masson et Cie.
1952, *11*, 989-997.

(66) DOBSON E.L., GOFMAN J.W., JONES H.B., KELLY L.S., WALKER L.A. - Studies with colloids containing radioisotopes of yttrium, zirconium, columbium and lanthanum.
II) The controlled selective localisation of radioisotopes of yttrium, zirconium, and columbium in the bone marrow, liver and spleen.
J. lab. clin. med., U.S.A.
1949, *34*, 305-312.

(67) DOBSON E.L., JONES H.B. - The behaviour of intravenously injected particulate material. Its rate of disappearance from the blood stream as a mesure of liver blood flow.
Acta Med. Scand.
1952, 144, suppl. 273, 71.

(68) DONATO L., BECCHINI M.F., PANICHI S. - Liver scanning with colloidal radiogold.
Int. j. appl. rad. isot., G.B.
1959, *5*, 2, 151.

(69) DOREMUS R.H. - Optical properties of small gold particles.
J. Chem. Phys., U.S.A.
1964, *40*, (8), 2389-2396.

(70) DOUIS M. - Préparation de l'or colloïdal 198.
Minerva nucl., Ital.
1963, 7 (11), 448-450.

(71) DUCLAUX J. - Mouvement Brownien.
in : Traité de chimie physique. t. II, ch. 5 et 6.
Herman et Cie, Paris.
1938.

(72) DUCLAUX J. - Colloïdes et gels.
Ed. Gauthier Villars. Paris 1953.

(73) DYBICKI J., BALCHUM O. J., MENEELY G. R. - Treatment of pleural and peritoneal effusion with intracavitary colloïdal radiogold ($^{198}$Au).
Arch. intern. med., U. S. A.
1959, *104*, 802-815.

(74) EKHOLM R. - Articular cartilage nutrition.
Acta. anat., Suisse.
1951, Vol. XI suppl. 15-2, 5-76.

(75) FLOCKS R. H. - Interstitial irradiation therapy with a solution of $^{198}$Au as part of combination therapy for prostatic carcinoma.
J. of Nuclear Medecine, U. S. A.
1964, *5* (9), 691-705.

(76) FLOCKS R. H., KERR H. D., ELKINS H. B., CULP D. - Treatment of carcinoma of the prostate by interstitial radiation with radioactive gold (Au198) : a follow up report.
J. urol.
1954, *71*, 628-633.

(77) FLODIN P., KILLANDER J. - Fractionation of human serum proteins by gel filtration.
Biochem. biophys. Acta, Pays-Bas.
1962, *63*, 403-410.

(78) FONTAINE R. - De la répartition de l'or colloïdal dans les ganglions axillaires après injection interstitielle dans le cancer du sein.
Press. med., Fr.
1956, *64*, 34, 817.

(79) FOUSSARD-BLANPIN O., GIRAUD-DOZIAS Cl. - Modifications dans certains cancers expérimentaux de l'évolution du processus inflammatoire.
Tours 5-12 Juillet 1965.
LXXXIV congrès de l'association pour l'avancement des Sciences.

(80) FRANCHESCHINI P. - Sistema istiocitario.
Edit. Scient. Salpiétrié. Firenze.
1954.

(81) FREUNDLICH H. - Die Bedeuntung der Adsorption bei der Fällung der suspensions Kolloide.
Z. Physik. Chem. Frankfurt.
1910, *73*, 385-423.

(82) GALLE P., RAYNAL M., TUBIANA M. - Etude comparative des activités urinaire et sanguine de deux radiocolloïdes d'or 198 injectés dans les cavités péritonéale et pleurale.
J. Radiol. Electrol. Med. Nucl., Fr.
1965, *46*, 5, 278-287.

(83) GASSO G., BILLITTERI A., ROMEO S. - Fonction réticulo-endothéliale chez l'animal irradié, étudiée à l'aide de $^{198}$Au en suspension colloïdale.
Minerva Nucl., Ital.
1963, 7 (6), 251-252.

(84) GIORDANO D., RINALDIS P. de, SALAMANNA S. - Comportement électrophorétique et période du $^{198}$Au en injection intraveineuse chez le lapin.
Minerva Nucl., Ital.
1962, 6 (12), 395-397.

(85) GIRAD M., DECHOSAL J., ROUSSELET F. - Pratique d'électrophorèse sur papier en Biologie Clinique.
Doin Ed., Paris 1958.

(86) GIRARDI F., PIETRA R. - Analyse par centrifugation des dimensions des particules d'or colloïdal radioactif.
Minerva Nucl., Ital.
1961, *5* (5), 97-101.

(87) GOLDSTEIN A. - The interactions of drugs and plasma proteins.
Pharmacol. Rev.
1949, *1*, 102-165.

(88) GORNALL A.G., BARDOWILL C.T., DAVID M.M. - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem., U.S.A.
1949, *177*, 751-766.

(89) GOSSELIN R.E. - The uptake of radiocolloids by macrophages *in vitro*. A kinetic analysis with radioactive colloidal gold.
Univ. Rochester.
Atomic Energy Project.
Rochester N.Y. - 1956.

(90) GOUY - Le mouvement brownien et les mouvements moléculaires.
Revue générale des Sciences.
1895, *6*, 1-7.

(91) GRAHAM Th. - Anwendung der Diffusion der Flüssigkeiten zur Analyse.
Annalen der chemie und pharmacie.
1862, *121*, 1-77.

(92) GRASSMANN W., HANNIG K., KNEDEL M. - Die elektrophorese der serum Proteinen.
Dtsch. med. wsch.
1951, *76*, 333.

(93) GRECO S., SPINA F., GASSO G. - Fonction réticulo-histiocytaire chez les porteurs de tumeurs. Etude faite à l'aide d'$^{198}$Au.
Radiobiol. Latina., Ital.
1962, *5* (4), 407-413.

(94) GUERIN M. Th., GUERIN R.A. - Liaisons aux protéines sériques du radiocalcium ($^{47}$Ca) et du radiostrontium ($^{85}$Sr).
Path. Biol.
1965, *13* (5-6), 297-301.

(95) GUILLOT M. - Les liaisons contractées par les protéines avec les corps transportés.
in : Rôle de transport des protéines plasmatiques.
V° Symp. Ouest Europ. de Chimie Clinique.
Paris 1965.

(96) HAHN P.F., CAROTHERS E.L. - Use of radioactive colloïdal metallic gold in the treatment of malignancies.
Nucleonics, U.S.A.
1950, *6*, 54-62.

(97) HAHN P.F., GOODELL J.P.B., SHEPPARD C.W., CANNON R.C., FRANCIS H.C. - Direct infiltration of radioactive isotopes as a means of delivering ionizing radiation to discrete tissues.
J. Lab. Clin. Med., U.S.A.
1947, *32*, 1442-1453.

(98) HAHN P.F., MENEELY G.R., CAROTHERS E.L. - The use of gold and silver coated radioactive gold colloids in the palliation of ascites and pleural effusions.
Brit. J. Radiol.
1958, *31*, 365, 240-245.

(99) HALPERN B.N., BENACERRAF B., DELAFRESNAYE J.P. - Physiopathology of the reticulo-endothelial system.
A symposium Oxford 1957.
Blackwell scient. public. Ed.

(100) HALPERN B.N., BIOZZI G., MENE G. - Technique d'étude quantitative de l'activité du S.R.E.
C.R. Soc. Biol., Fr.
1950, *144*, 232-234.

(101) HALPERN B. N., BIOZZI G., STIFFEL C. - Etude de la fonction phagocytaire et métabolique du système réticulo-endothélial à l'aide d'un complexe protéinique marqué à l'$^{131}$I.
in : EXTERMAN R. C.
Radioisotopes in scientific research.
Pergamon Press. London 1958.

(102) HAMAKER - A general theory of lyophobic colloïds.
Rec. trav. chim., Pays-Bas.
1936, *55*, 1015-1026.

(103) HARDY W. B. - A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols.
Proc. R. soc., G. B.
1900, *66*, 110-125.

(104) HEIM W. G., KERRIGAN J. M. - Appearance of slow $\alpha_2$ globulin after interference with the liver.
Nature, 1963.
1963, *199*, 1100- 1101.

(105) HELLER H., RANSOM P., PASTERNAK V. Z. - New advances in the stimulation of the R. E. S.
in : HALPERN B. N.
Colloques C. N. R. S. Gif-sur-Yvette.
1962, 89 à 105.

(106) HENRY R., HERCZEG C., FISHER C. - Une nouvelle méthode de préparation d'or colloïdal radioactif.
Internation. J. Appl. Rad. Isotopes, G. B.
Pergamon Press Ltd, London.
1957, *2*, 136-139.

(107) HERVE A., GOVAERTS J. - Etude de la distribution dans l'organisme du phosphate de chrome radioactif injecté par voie I. V.
Acta radiol.
1951, *35*, 257-264.

(108) HOFFMANN G. - Les animaux de laboratoire.
Vigot Frères - Paris, 1963.

(109) HOLBROOK M. A., CHILDS D. S. - Adjuvant use of radioactive colloids in the treatment of carcinoma of the ovary.
Radiology (U. S. A.).
1964, *83* (5), 888-891.

(110) HOUSSAY A. B. - Physiologie humaine.
Editions médicales Flammarion.
1947, (I), 70.

(111) IRWIN D. A. - The experimental intravenous administration of colloidal thorium dioxide.
Can. med. Assoc. J.
1932, *27*, 130-135.

(112) JACKEL K. - Uber die Funktionen des Schutzkolloids.
Kolloid. Z. Dtsch.
1964, *197* (1/2), 143-151.

(113) JEROME H. - Transport du cuivre par les protéines sanguines.
in : Rôle de transport des protéines plasmatiques.
V° Symposium Ouest Européen de Chimie Clinique.
Paris 12-13 Avril 1965.

(114) JIRGENSONS B., STRAUMANIS M. E. - A short textbook of colloid chemistry.
Pergamon Press, London.
1962.

(115) KERR H. D., FLOCKS R. H., ELKINS H. B., CULP D. - The treatment of moderately advanced carcinoma of the protate with radioactive gold.
Am. J. Roentgenol, Radium therapy nucl. Med.
1953, *69*, 969-977.

(116) KORVER G. - Elektrophorese im Filtrierpapier, ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Serumeiweisskörper.
Klin. wschn. Dtsch.
1950, *28*, 693-694.

(117) KRUYT H. R. - Colloid sciences
Elsevier - Amsterdam
1949, I - II

(118) KRUYT H. R., OVERBEEK J. Th. G. - Initiation à la chimie physique ; chimie colloïdale en particulier.
Masson et Cie. 1961.

(119) KYKER G. C., TORIELLO J., KNISELEY R. H. - Interstitial yttrium in prostate and parametrium.
Feder. Proc., U. S. A.
1955, *14*, 240-241.

(120) LAHR T. N., OLSEN R., GLEASON G. I., TABER D. L. - Animal distribution of colloids of $^{198}Au$, $^{30}P$ and $^{90}Y$.
An improved method of tissue essay for radioactivity.
J. Lab. Clin. Med., U. S. A.
1955, *45*, 66.

(121) LANDUCCI, POURADIER, DURANTE - Recent advance in gelatin and glue research
Pergamon Press.
1958, 62.

(122) LARSON L. G., JONSSON L. - Bone marrow scanning after intravenous injection of colloïdal $^{198}Au$.
Medical radioisotope scanning.
A. I. E. A. Vienne - 1964 - p. 193.

(123) LAWFORD D. J. - An abnormal serum protein in experimental poisoning by cadmium and other metals.
Nature.
1960, *187*, 946-947.

(124) LEGER L., DESGREZ A., MAGDELAINE M. - L'exploration morphologique comparée du foie par splénoportographie et scintillographie.
Presse Med., Fr.
1963, *71*, 34.

(125) MARCY R. - Les méthodes d'études pharmacologiques des stéroïdes anti-inflammatoires.
Prod. Probl. Pharm., Fr.
1961, *16*, 9, 402-424.

(126) MARIGNAN R. - Quelques problèmes physico-chimiques posés par l'emploi des colloïdes radioactifs.
Minerva Nucl. Ital.
1963, 7 (11), 441-446.

(127) MARIGNAN R. - Confrontation sur la biologie des radiocolloïdes.
I. N. S. T. N. Saclay 1965
DR/gep/65-12/IJ/RA.

(128) MAUPIN B., LOVERDO A. - Marquage "*in vitro*" par $^{198}Au$ colloïdal des leucocytes et des plaquettes du sang humain.
C. R. Soc. Biol., Fr.
1958, *152*, 2, 277-279.

(129) MAXIMOV A. A. - Relation of blood cells to connective tissue and endothelium
Physiol. Rev. U. S. A.
1924, *4*, 533-563.

(130) McBAIN J. W. - Colloid Science.
Heath and Co, Boston, 1950.

(131) MEREDITH O. M. - Kinetics of reticulo-endothelial phagocytis response to intravenously administered $^{198}Au$ colloïdal gold in rabbits.
Arch. Biochem. Biophys.
1961, *95*, 352-362.

(132) METCHNIKOFF E. - Etudes sur l'immunité.
Sixième mémoire : sur la destruction extracellulaire des bactéries dans l'organisme.
Ann. Inst. Pasteur, Paris.
1895, *9*, 433-461.

(133) MEUNIER M. M. - Contribution à l'étude de la liaison de quelques médicaments aux protéines sériques.
Thèse (pharmacie). Clermont-Ferrand, 1961.

(134) MIDER G. B., ALLING E. L., MORTON J. J. - The effect of neoplastic and allied diseases on the concentrations of the plasma proteins.
Cancer.
1950, *3*, 56-65.

(135) MULLER J. H. - Remarques sur les interactions des thérapies par radio-colloides avec le système reticulo-endothélial.
J. Radiol. Electrol. Med. Nucl., Fr.
1965, *46*, 5, 266-269.

(136) MUNIER R. L. - Chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne
in : LOISELEUR J.
Techniques de laboratoire.
Masson et Cie.
1963, *1*, 1, 576-587.

(137) MURRAY I. M. - Interaction of gelatin-stabilized radiogold colloid and plasma proteins.
Proc. soc. exper. Biol., Med., U. S. A.
1956, *91*, 252.

(138) MURRAY I. M. - The mecanism of blockade of the reticulo-endothelial system.
J. exp. Med., U. S. A.
1963, *117*, 139-147.

(139) MYERS R. R. - Symposium on physical functions of Hydrocolloids.
Meeting Ann. chem. Soc. (Septembre 1956).

(140) NEWBOULD B. B. - Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant.
Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy.
1963, *21*, 127-136.

(141) NICOL T. - The uterus of cavia after intravitam staining with trypan blue.
J. Anat., G. B.
1932, *66*, 181-188.

(142) NICOL T., CORDINGLEY J., CHARLES L., McKELVIE P., BILBEY D. - Effect of reticulo-endothelial stimulation on experimental injections.
in : HALPERN B. N.
Rôle du S. R. E. dans l'immunité antibactérienne et anti-tumorale.
C. N. R. S. Ed. Paris.
1963, 166-183.

(143) NICOL T., WARE C. C., BILBEY D. L. J. - Effect or certain polyphenylated aliphatic hydrocarbons on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system.
Nature.
1958, *181*, 1804.

(144) OLD L. J., BENACERRAF B., CLARKE D. A., CARSWELL E. A., STOCKERT E. - The rôle of the reticulo-endothelial system in the host reaction to neoplasia.
Cancer Res., U. S. A.
1961, *21*, 1281-1301.

(145) OSTWALD Wo - Grundriß der Kolloidchemie.
Dresden und Leipzig.
1909, *5*, 278.

(146) OTT H. - La liaison des particules colloïdales aux protéines du plasma
E. Exp. Med. (Dtsch).
1953, *122*, (4), 246-255.

(147) Pharmacopée Française
Soluté injectable d'or colloïdal radioactif.
1965, VIIIème édition, 1074-1077.

(148) PIERQUIN B., FISZER B., ABBATUCCI J., TUBIANA M. - Etude sur la répartition de l'or 198 colloïdal en injection interstitielle dans le tissu cellulaire S/C (tissu sain).
J. Radiol. Electrol. Med. Nucl. Fr.
1957, *38*, 1/2, 128-133.

(149) PLÜCKTHUN H., GOTTING H. - Beitrag zur Methode der elektrophoretischen Untersuchung der Serumeiweisskörper auf Filtrierpaper.
Klin. wschr. Dtsch.
1951, *29*, 415-418.

(150) PORATH J., FLODIN P. - Gel filtration.
in : PEETERS H.
Protides of the biological fluids.
Elsevier, Amsterdam.
1963, *X*, 290-297.

(151) POURADIER J. - Structure de la gélatine.
Chimie et Industrie.
1955, *74*, 6, 1175-1184.

(152) QUELET R. - Précis de chimie.
Presses Universitaires de France, Paris.
1961, *1*, 288-302.

(153) QUINKE G. - Über die Klärung trüber Lösungen.
Drudes ann. d. phys.
1902, *7*, 57-96.

(154) RANVIER L. - Des clasmocytes.
Arch. anat. micr. morphol. exper., Fr.
1900, *3*, 122-139.

(155) RAOUL Y. - Le transport des vitamines dans le sang.
in : Rôle de transport des protéines plasmatiques.
V ème Symposium Ouest Européen de chimie Clinique.
Paris 12-13 Avril 1965.

(156) REICHARD S. M. - Adrenal and hypophyseal influences upon the uptake of radioactive gold (Au198) by the reticulo-endothelial system
Endocrinology, U. S. A.
1956, *59*, 1, 55-68.

(157) RIOU G., TRUHAUT R., PAOLETTI C. - Electrophorèse des protéines plasmatiques du rat après intoxication par deux composés cancérigènes et hépatotoxiques : le bleu trypan et l'éthionine.
Rev. Fr. et Clin. Biol.
1962, *VII*, 618-628.

(158) ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. - Techniques radioisotopiques en chromatographie.
in : LEDERER S.
Chromatographie en chimie organique et biologique.
Masson, Paris.
1959, *2*, 321-358.

(159) ROCHE J., SALVATORE G. - Transport des hormones thyroïdiennes.
in : Rôle de transport des protéines plasmatiques.
V° Symp. Ouest Européen de chimie clinique.
Paris 12-13 Avril 1965.

(160) ROOT S. W., ANDREWS G. A., KNISELEY R. M., TYOR P. P. - The distribution and radiation effect of intravenously administrated colloïdal 198Au in man.
Cancer.
1954, *7*, 856-866.

(161) ROVELSTAD R. A., BARTHOLOMEW L. G., CAIN J. C., McKENZIE B. F., SOULE E. H. - Ascites. I. The value of examination of ascitic fluid and blood for lipids and for proteins by electrophoresis.
Gastroenterology.
1958, *34*, 436.

(162) RUSZNYAK I., FOLDI M., SZABO G. - Lymphatic and lymph circulation.
Ed. Academy Press, Budapest.
1960.

(163) SAGE H. H., SINHA B. K., KIZILAY D., TOULON R. - Radioactive colloidal gold measurements of lymph flow and functional patterns of lymphatics and lymph nodes in the extremities.
J. Of Nuclear Medecine (U. S. A).
1964, *5* (8), 626-642.

(164) SCATCHARD G., HUGUES W. L., GUD F. R. N., WILCOX P. E. - The interaction of proteins with small molecules and ions.
in : GURD F. R. N.
Chemical specifity in biological interactions.
Academic Press inc. N. Y. 1954.

(165) SHAW D. B., BREWS V. A. L. - An electrophoretic study of serum and pleural fluid proteins in chest diseases.
J. Clin. Path. G. B.
1956, *9*, 251-254.

(166) SHERMAN A. I., BONEBRAKE M. D., ALLEN W. M. - The application of radioactive colloïdal gold in the treatment of pelvic cancer.
Amer. J. Roentgenol Radium therapy nucl. med.
1951, *66*, 624-638.

(167) SICOT C., AFIFI F., BENHAMOU J. P., FAUVERT R. - Le phénomène de chasse au cours de la granulopexie
Etude préliminaire.
Rev. Fr. et Clin. Biol.
1963, *8*, 786-788.

(168) SIMON N. - Radioactive gold in filter paper electrophoresis pattern of plasma.
Science.
1954, *119*, 95.

(169) SLAUNWHITE W. R., SANDBERG A. A. - Trancortin : A corticosteroid-binding protein of plasma.
J. Clin. Invest. U. S. A.
1959, *38*, 384-391.

(170) SOUCHAY - Thermodynamique chimique.
Masson et Cie - Paris 1961.

(171) SPRING M. W. - Sur la floculation des milieux troubles.
Rec. trav. chim. Pays-Bas.
1900, *19*, 204-235.

(172) STAUDINGER H. - Organische Kolloidchemie.
Vieweg, Braunschweig, 1950.

(173) STERN - HAMBURG O. - Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht.
Z. Elektrochemie.
1924, *30*, 508-516.

(174) STIFFEL C. - Etude de la fonction phagocytaire du S. R. E.
J. Physiol. Fr.
1958, *50*, 911-913.

(175) STIRRETT L. A., YUHL E. T., CASSEN B. - Clinical applications of hepatic radiactivity surveys.
Am. J. gastroenterology.
1954, *21*, 310-317.

(176) THIESSEN P. A. - Wechselseitige Adsorption von Kolloiden.
Z. Elektrochemie.
1942, *48*, 675-681.

(177) THOMAS J. A. - Conception du système réticulo-histiocytaire.
Rev. hématol., Fr.
1949, *4*, 24, 639.

(178) TURKEVICH J., STEVENSON P. C., HILLIER J. - A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloïdal gold.
Discussion of the Faraday Society.
1951, *11*, 55-75.

(179) VANNINI P., IPPOLITO A. - Studio elettroforetico dei versamenti cavitari.
Arch. pat. clin. med. (Bologna).
1956, *33*, 70-82.

(180) VERWEY E. J. W., OVERBEEK Th. G. - Theory of the stability of hydrophobic colloids.
Elsevier, Amsterdam, 1948.

(181) WEIKEL J. H., LUSKY L. M. - Pharmacology of the R. E. S. Blockade by polyvinyl-pyrrolidone (PVP) as measured with radiochromic phosphate in the rabbit.
J. Pharmacol. Exp. Therap. U. S. A.
1956, *118*, 2, 148-152.

(182) WELIN L. - Fixation des médicaments par les protéines plasmatiques.
Thèse Pharmacie (Etat).
Paris 1964.

(183) WELLAUER J., DEL BUONO M. S., RUTTIMANN A. - La lymphographie comme méthode de dépistage des métastases dans le système tumeur-ganglions lymphatiques-métastases.
Strahlentherapie.
1963, *120* (4), 631.

(184) WEN I. C., JUNG T. S. - Changes in tissues after intravenous injection of colloidal thorium dioxide.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. U. S. A.
1933, *31*, 330-332.

(185) WEPIERRE J. - Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le p. cymène marqué au carbone 14.
Thèse (Sciences).
Paris 1963.

(186) WINKEL K. - Funktionsuntersuchungen des Lymphsystems mit radioaktiven Substanzen.
in : Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung Urban
Schwarzenberg - Munchen Berlin.
1965, *6*.

(187) WUHRMANN F., JASINSKI B. - Untersuchungen über die Bindung des Eisens an das Serumglobulin β1 mit Hilfe des Radioeisens $^{59}Fe$ und dessen Klinische Bedeutung.
Schweiz. med. Wschr.
1953, *83*, 661-665.

(188) WUHRMANN F., WUNDERLY Ch. - Les protéines du sang humain.
Editions médicales Flammarion, 1961.

(189) WUNDERLEY Ch. - Principles and applications of paper electrophoresis.
Elsevier publishing company.
Amsterdam 1961.

(190) ZILVERSMIT D. B., BOYD A., BRUCER M. - The effect of particle size on blood clearance and tissue distribution of radioactive gold colloid.
J. Lab. Clin. Med. U. S. A.
1952, *40*, 255-260.

(191) ZIYAEV Sh. I - The distribution of colloïdal radiosilver in intravenous administration to healthy rabbits and rabbits with Brown-Pearce carcinoma.
Meditsinskaya Radiologiya (U. R. S. S.).
1964, 9 (2), 72-75.

(192) ZSIGMONDY R. - Die hochrothe Goldlösung als Reagens auf Colloïde.
Z. Anal. Chem., Dtsch.
1901, *40*, 697-719.

Manuscrit reçu le 11.7.1966

Vu et approuvé :
Paris le 26 Mai 1966
Le Doyen,
G. VALETTE

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
de Paris,
J. ROCHE

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN
Ouvrages scientifiques
TYPO-OFFSET
GAP (Hautes-Alpes)
Dépôt légal n° 27
1967